

**ESR-Untersuchungen über die Bindung von Mn^{++} -Ionen
an Mitochondrien**

Dieter Brunner

1977



ESR-Untersuchungen über die Bindung von Mn^{++} -Ionen
an Mitochondrien

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Dieter Brunner
aus
München

Juni 1976



Berichterstatter: 1. Prof. Dr. J. Voithländer
Prof. Dr. M. Klingenberg

2. Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung 2. 2. 1977

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physikalische Biochemie der Universität München in der Zeit vom September 1972 bis Oktober 1975 durchgeführt.

Die Betreuung der Arbeit lag in den Händen von Prof. Dr. M. Klingenberg - Institut für Physikalische Biochemie - und Prof. Dr. J. Voithländer - Institut für Physikalische Chemie.

Ich danke den obengenannten Herren Professoren für die Überlassung des Themas und für zahlreiche wertvolle Diskussionen.

Dem Sonderforschungsbereich SFB 51, der diese Arbeit über die Dauer von 15 Monaten förderte gilt ebenso mein Dank, wie auch den Leibniz Rechenzentren der Bayerischen Akademie der Wissenschaften für umfangreiche Rechenzeit.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555615_0066

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
2.	Biochemische Aspekte der Mn^{++} -Bindung an Mitochondrien	4
2.1	Experimentelles	4
2.2	Mn^{++} -Bindung und Membranfunktion	5
2.3	Kompetition zwischen Mn^{++} , Ca^{++} , Mg^{++}	8
2.4	Inhibierung und Reversibilität der Mn^{++} -Bindung	11
2.5	Stimulierung der Mn^{++} -Bindung durch PO_4	13
2.6	Mn^{++} -Bindung als Funktion von pH, Protein-, Mn^{++} -Konzentration	14
3.	Das ESR-Spektrum des Mn^{++} -Ions	17
3.1	Relaxation von Mn^{++} in wäßrigen Lösungen	19
3.2	Redfield'sche Relaxationstheorie und ihre Anwendung auf Mn^{++}	21
3.3	Berechnung der Elemente der Relaxationsmatrix	25
3.4	Berechnung und Simulation der Mn^{++} -Spektren in wäßrigen Lösungen	27
3.4.1	Feldkoordinaten der Übergänge im X-BAND und Q-BAND	30
3.4.2	Relaxationsraten und Intensitäten der ESR-Übergänge	31
3.4.3	Simulierte Spektren und Linienbreiten	33
3.5	Gültigkeit des Redfield'schen Formalismus	42
4.	ESR Untersuchungen von Mn^{++} in Mitochondrien	43
4.1	Übersicht über Versuchsablauf und Auswertung	45
4.2	Zerlegung der Mn^{++} -Spektren von Mitochondrien	47
4.3	Bindung von $^{54}Mn^{++}$	51
4.4	Quantifizierung der Mn^{++} -Spektren	51
5.	ESR Messungen an mitochondrial gebundenen Mn^{++} im X- und Q-BAND	53
5.1	Übersicht	53
5.2	Vergleich der ESR-Daten mit den $^{54}Mn^{++}$ -Bindungsdaten	59
5.3	Folgerungen aus dem Vergleich der X- und Q-BAND-Messungen	61
5.4	Weitere ergänzende ESR-Messungen	63
5.4.1	Fortsetzung der ESR-Messungen zu niedrigen Proteinkonzentrationen, pH-Abhängigkeit des ESR-Signals	63

5.4.2	Einfluß von DNP und Ruthenium Red auf das ESR-Spektrum	64
5.4.3	Membranintegrität und ESR-Spektrum	65
5.5	Zusammenfassung und Modellbildung	66
6.	Spinlabel-Mn ⁺⁺ -Wechselwirkung in der Mitochondrienmembran	68
6.1	Spinlabel in biologischen Membranen	68
6.2	Spinlabel-Mn ⁺⁺ -Wechselwirkung (Theorie)	71
6.3	Inkorporation des Spinlabels und Membranfunktion	73
6.4	Ergebnisse und Diskussion	75
7.	Zusammenfassung	78

ANHANG I: ALGOL-Programm zur Spektren-Simulation

ANHANG II: ALGOL-Programm zur Zerlegung der gemessenen Spektren, Demonstration der Eindeutigkeit der Zerlegung

ANHANG III: Theorie der Linienform

1. Einleitung

Mitochondrien sind wesentliche Strukturelemente der Zelle. Es sind lichtmikroskopisch erkennbare, ellipsoidförmige Gebilde mit Abmessungen $3\mu m \cdot 1\mu m \cdot 1\mu m$.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen (1) zeigen eine vielfach gefaltete Innenmembran, welche den sogenannten Matrixraum umschließt. Dieser Innenmembran schließt sich nach außen hin eine weitere Membran an. Zwischen diesen beiden Membranen liegt der Intermembranraum.

Die wesentlichste Eigenschaft aller biologischen Membranen, eine Permeationsbarriere für verschiedenartige Substanzen aufzubauen, ist auch in der inneren Mitochondrienmembran realisiert. So ermöglicht sie H_2O , O_2 , und CO_2 einen unspezifischen Transport mittels Osmose bzw. Diffusion; Adeninnukleotide, Phosphat, Pyruvat und Fettsäuren hingegen werden unter Energieaufnahme mittels eines Carriers bedeutend schneller transportiert. Dieser selektive Transport ist eng gekoppelt an die Funktionen der Mitochondrien im Zellverband:

Die Innenmembran ist Träger der Komponenten der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung. Der Matrixraum beinhaltet die Enzyme des Citratzyklus und der β -Oxidation der Fettsäuren.

In den frühen 60er Jahren entdeckten Vasington und De Luca (2), daß Mitochondrien unter Energieverbrauch große Mengen an Ca^{++} -Ionen über ihren Eigengehalt an Ca^{++} hinaus akkumulieren können. So erfordert die Aufnahme von 2 Ca^{++} -Ionen die gleiche zusätzliche Sauerstoffaufnahme wie die Bildung von einem Molekül ATP aus ADP und PO_4 .

So nimmt man heute an (3), daß die Mitochondrien an der Steuerung des Ca-Stoffwechsels im Zytosol beteiligt sind.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß Ca^{++} nur in Gegenwart von permeationsfähigen Anionen wie NO_3 , Azetat und vor allem PO_4 im Matrixraum erscheint. Dort bildet es dann amorphe Ablagerungen vom Typ Ca-Apatit. In Abwesenheit der oben genannten Anionen werden die Ca^{++} -Ionen in bzw. an der Innenmembran gebunden.

Für die Bindung von Ca^{++} in der Innenmembran unterscheidet man zwei Bindungsorte:

- (a) hochaffine Bindungsstellen geringer Konzentration
(1 nmol/mg Protein)
- (b) niedrigaffine Bindungsstellen mit einer Besetzbarkeit
bis zu 100 nmol/mg Protein

Die hochaffinen Bindungsstellen werden aufgrund ihrer hohen Spezifität für Ca^{++} - nur Ca^{++} , Sr^{++} , Mn^{++} werden von allen zweiwertigen Ionen gebunden und transportiert - und der Existenz der Inhibitoren La^{+++} und Ruthenium Red, die in Konzentrationen von 1 nmol/mg die Bindung von Ca^{++} verhindern, einem Ca^{++} -Carrier zugewiesen.

Die niedrigaffinen Bindungsstellen könnte man "Warteplätzen" gleichsetzen, ihre Lokalisation in der Lipid- oder Proteinschicht der Innenmembran ist umstritten und, da aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht entscheidbar, ein wesentlicher Gegenstand dieser Arbeit.

Wie schon oben erwähnt, kann das Ca^{++} -Ion in Mitochondrien durch das paramagnetische, durch ESR nachweisbare Mn^{++} -Ion ersetzt werden. Ziel solcher ESR-Messungen an mitochondrialgebundenem Mn^{++} ist es, Aussagen über die nähere molekulare Umgebung des Mn^{++} in der Membran zu erhalten. Die Autoren Gunter und Puskin (4) beobachteten im X-BAND, nachdem sie die Mn-Akkumulation durch EDTA stoppten, eine Absorptionslinie mit einer Linienbreite kleiner 250 Gs, der ein Mn-Sextett, verursacht von freien Mn^{++} -Ionen, überlagert war. Das Sextett ordneten sie den im Matrixraum freien Mn^{++} -Ionen zu.

Das schmale Absorptionssignal entsteht durch Austauschwechselwirkung zwischen nahe benachbarten Mn^{++} -Ionen. Als Ort dieser Austauschwechselwirkung postulierten Gunter und Puskin die Innenmembran.

Ein Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit ist es, diese These durch weiterführende ESR-Messungen zu überprüfen.

So muß ausgeschlossen werden, daß das beobachtete Exchangesignal nicht von einem Mn-Präzipitat im Matrixraum herrührt. Dies wird möglich, wenn man die X-BAND Messungen an Mitochondrien in den beiden folgenden Zuständen vergleicht:

N-System: Mitochondrien + Mn^{++}

P-System: Mitochondrien + Mn^{++} + PO_4

Die Untersuchung der Linienbreite des Exchangesignals beim Übergang in das Q-BAND wird eine weitere Differenzierung der beiden Systeme ermöglichen.

Durch den Einbau von Fettsäure- und Phospholipid-Spinlabel in die Lipidphase der Membran kann dann ein direkter Nachweis der dort gebundenen Mn^{++} -Ionen erbracht werden.

Die Weiterführung der Puskinschen Messungen in das Q-BAND ermöglicht außerdem eine eindeutige Bestimmung der Parameter τ_c und Δ des Mn^{++} -Ions im Matrixraum. Diese Parameter beschreiben zum einen die Korrelationszeit der dynamischen Prozesse, welche die Nullfeldaufspaltung modulieren, zum anderen den Grad der axialen Verzerrung der oktaedrischen Ligandenanordnung des Mn^{++} -Ions.

Schließlich soll mit Hilfe von radioaktivmarkiertem Mn^{++} gezeigt werden, daß die beobachteten Spektren im X-BAND und Q-BAND quantifizierbar sind, d.h. daß alles gebundene Mn^{++} auch im ESR-Spektrum sichtbar wird, sich also kein Anteil in einer überbreiten Linie versteckt.

Am Anfang der Arbeit steht eine Aufbereitung und Weiterführung der biochemischen Untersuchungen zur Mn^{++} -, Ca^{++} und Mg^{++} -Bindung (5). So muß gezeigt werden, daß alle wesentlichen Eigenschaften der Ca^{++} -Bindung wie Inhibierung, Stimulierung und Reversibilität auf die Mn^{++} -Bindung übertragbar sind und die Membranfunktion durch Mn^{++} -Ionen nicht beeinträchtigt wird. Die X-BAND und Q-BAND Messungen erfordern darüber hinaus eine Optimierung der Bindungsparameter wie pH, Proteinkonzentration, Mn -Konzentration und Inkubationsdauer.

Wenn auch die ESR-Messungen an Rinderherzen-Mitochondrien (BHM) fast durchwegs ähnliche Ergebnisse wie an Rattenleber-Mitochondrien (RLM) erbrachten, wurden die hier niedergelegten Ergebnisse vorwiegend aus Messungen an RLM gewonnen. Dies hat drei Gründe:

- a) leichtere Verfügbarkeit der RLM gegenüber den BHM
- b) geringerer endogener PO_4 -Gehalt der RLM
- c) ein Vergleich mit den literaturüblichen Messungen an RLM wird möglich.

2. Biochemische Aspekte der Mn^{++} -Bindung an Mitochondrien

2.1. Experimentelles

Frisch geschlachteten Ratten wird die Leber entnommen, in 10mM TRAP, 250mM Sucrose und 2mM EDTA pH 7.2 homogenisiert und anschließend bei 480g zentrifugiert. Der Überstand wird bei 9750g zentrifugiert, das neue Sediment dann im gleichen Medium ohne EDTA resuspendiert und noch einmal gewaschen. Die Proteinkonzentration der mitochondrialen Stammsuspension wird nach der Biuret-Methode (6) bestimmt, sie liegt in der Größenordnung 50 mg/ml.

Die Bindung von radioaktivem $^{54}\text{Mn}^{++}$ erfolgt in einer mitochondrialen Suspension von 10 mg/ml, bei einem Volumen von 1ml, in Plastikcups in dem oben beschriebenen Medium. Es werden je nach Experiment 50-200 nmol/mgProtein $^{54}\text{Mn}^{++}$ zugesetzt, nach 10 Min. wird die Mn^{++} -Bindung durch Zugabe eines leichten Überschusses an EDTA gestoppt. Die Probe wird bei 6000g abzentrifugiert und ein Aliquot des Überstandes ($100\mu\text{l}$ - $500\mu\text{l}$) zusammen mit einem Aliquot aus einer Probe ohne Mitochondrien (cpm_t) in den Beckman γ -Zähler gegeben.

Als Einheit für die Mn^{++} -Bindung wird im folgenden nmol/mgProtein (abgekürzt : U) benützt.

$$\text{Mn}_b = \text{Mn}_t \left(1 - F \frac{f_{\text{ü cpm}_t}}{f_{\text{t cpm}_t}} \right) / \text{Pro}; \quad \text{Mn}_t = \text{eingesetzte Menge von Mn (nmol)}$$

$$f_{\text{ü, t}} = \frac{\text{Volumen für } \gamma\text{-Zähler}}{\text{Ausgangsvolumen}}$$

Mn_b = an Mitochondrien gebundenes Mn^{++}

Pro = eingesetzte Menge der Mitochondrien in mg.

F = 0.95 berücksichtigt das in dem Raum zwischen Außen- und Innen-Membran gebundene Mn^{++} , welches vom gesamtgebundenen Mn^{++} in Abzug gebracht werden muß.

Die Sauerstoffaufnahme der Mitochondrien wird in einem Inkubationsgefäß (750 μl) mit einer Sauerstoffelektrode (7) auf polarographischer Grundlage gemessen. Das Inkubationsmedium wird vorher bei 20° C mit Sauerstoff bis zu einer Konzentration von 480mM $\frac{1}{2} O_2$ angereichert. Messungen der Mg^{++} Konzentration erfolgen mit der Atom-Absorptions-Apparatur von Perkin Elmer bei $\lambda = 282nm$. Die untere Nachweisgrenze liegt bei $< 1 \mu M Mg^{++}$.

Experimente, bei denen der β -Strahler $^{41}Ca^{++}$ zugesetzt wird, erfordern als Zähler einen Liquid Scintillation Analyzer (Philips). Die Auswertung erfolgt analog zur $^{54}Mn^{++}$ -Auswertung.

Die folgenden Abkürzungen werden durchwegs benützt:

ADP : Adenosindiphosphat	MOPS : Morpholinpropan Sulfonsäure
CAT : Carboxyatractylat	TRIS : Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
BKA : Bongkrekat	TRAP : Triäthanolamin-Hydroxychlorid
DNP : 2,4 Dinitrophenol	FCCP : Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
AA : Antimycin A	
RO : Rotenon	
RR : Ruthenium Red	
EDTA : Äthylendiamintetraacetat	

2.2. Mn^{++} Bindung und Membranfunktion

Im folgenden soll untersucht werden, ob und wie weit Mn^{++} die Membranfunktion der Mitochondrien beeinträchtigt.

Als Kriterium für eine intakte Mitochondrienmembran gelte zunächst die Atmungskontrolle, d.h. das Verhältnis des Sauerstoffverbrauchs (pro Min.) in Gegenwart von Substraten, PO_4 , und ADP zum Sauerstoffverbrauch ohne ADP (8). Das Optimum dieses Verhältnisses liegt bei AK = 6.

Abb. 2.1 zeigt Kurven der Sauerstoffelektrode, oben ohne Zugabe von Mn^{++} , unten mit $Mn^{++} = 200 U$.

Mn^{++} hat demnach bis zu Konzentrationen von 400 U keinen Einfluß auf die Atmungskontrolle. Höhere Mn^{++} -Konzentrationen führen infolge " $MnPO_4$ "-Ablagerungen in den Mitochondrien zum Ausflocken der Mitochondrien-Suspension.

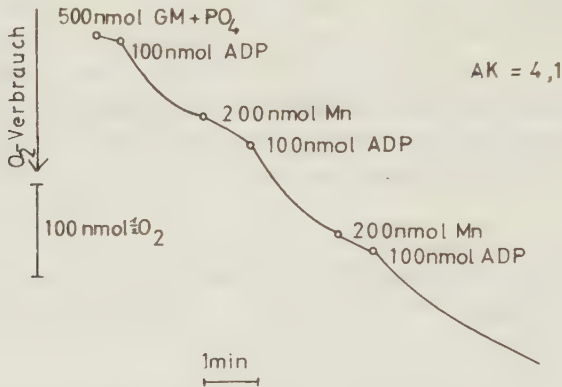


Abb. 2.1: Atmungskontrolle an RLM $\pm$ Mn^{++}

Ein weiteres Kriterium für die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien-Membran ist das Phänomen des Schwellen-Schrumpfens, wie man es vorzugsweise an den Mitochondrien aus Rinderherzen beobachtet (BHM).

Eine etwa 1mg/ml Suspension von BHM wird im Eppendorf-Photometer bei $\lambda = 546nm$ beobachtet ($E=1$, $\Delta E=0.1$). Zugabe von ADP ($1 \mu M$) führt zu einer Extinktionserhöhung, verursacht durch das veränderte Streuverhalten der Mitochondrien infolge ihrer Kontraktion.

Ursache dieser Kontraktion ist nach Klingenberg und Scherer (9) eine Umverteilung des ADP-Carriers über die Membran: Die Gegenwart von ADP induziert eine höhere Carrierdichte auf der Innenseite der Innenmembran. Diese Verteilung wird irreversibel durch Zugabe von BKA, welches durch Bindung an den Carrier von der Innenseite her diesen immobilisiert. Dies äußert sich in einer weiteren Extinktionszunahme. Antagonistisch dazu ist die Wirkungsweise des CAT, welches als Kompetitor zu ADP den Carrier von außen her immobilisiert und so zu einem Schwellen der Mitochondrien führt (Extinktionsabnahme).

Abb. 2.2 zeigt Extinktionsänderungen an BHM in Gegenwart von 300 U Mn^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} .

Die Zugabe von Mn und Ca verursacht ein geringes Schrumpfen der BHM. Zugabe von ADP und BKA ergeben aber immer noch Extinktionserhöhungen (ΔADP , ΔBA), welche mit dem Kontrollversuch vergleichbar sind.

Eine Titration der Mitochondrien mit Mn^{++} im Bereich 20U - 460U ergab erst bei Werten oberhalb 200U signifikante Einbrüche im Kontraktions-Verhalten.

Dieses Ergebnis korreliert auch mit den Resultaten des ADP Transports, welcher durch Mn^{++} in 1. Näherung nicht beeinflusst wird. Außerdem entnimmt man der Abb. 2.2, daß Mg^{++} die Kontraktion der Mitochondrien nicht beeinflusst. Dies zeigt uns, daß das Ca^{++} -Ion nur durch Mn^{++} , nicht aber durch Mg^{++} ersetzt werden darf. Weitere Untersuchungen dieser Art werden im folgenden Abschnitt mitgeteilt.

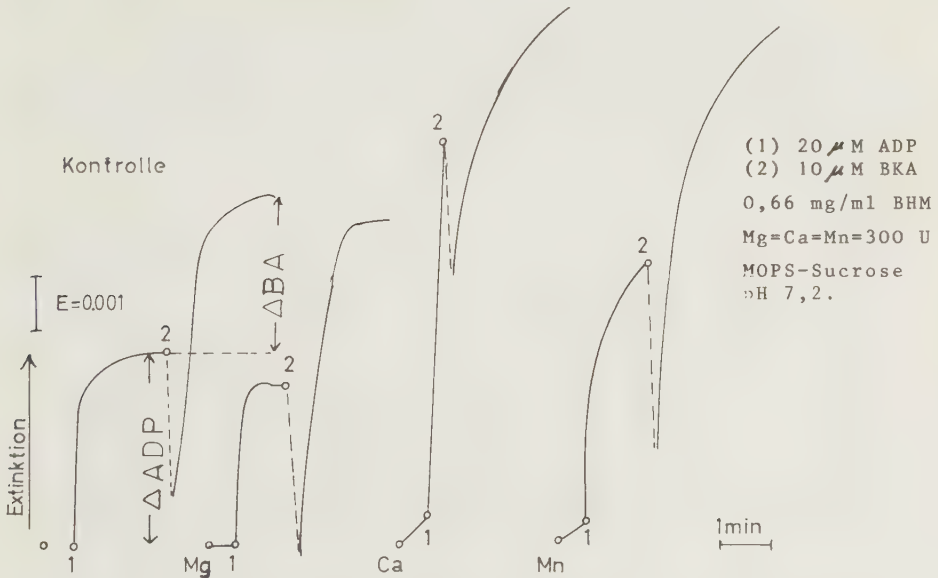


Abb. 2.2: Schwellen und Schrumpfen der BHM in Gegenwart von Mg, Ca, Mn

2.3. Kompetition zwischen Mn^{++} , Ca^{++} , Mg^{++}

Bindung und Einfluß von Mn^{++} auf die Integrität der Mitochondrien-Membran sollen nun verglichen werden mit den Ionen Ca^{++} und Mg^{++} ! Letztere sind aufgrund ihrer Stellung im Periodensystem und ihrer Ionenradien mit Mn^{++} vergleichbar.

Zunächst sei der Gehalt dieser Ionen in Rattenlebermitochondrien (RLM) mitgeteilt (10).

Ca	5.6 U		
Mg	42 U	$U = \frac{\text{nmol}}{\text{mg Protein}}$	
Mn	0.4 U		

Der hohe Anteil des Mg^{++} legt die Vermutung nahe, daß eine Bindung von Mn^{++} an Orten der Mg-Bindung stattfindet.

In Abb. 2.3 ist die Bindung von Mn^{++} und der Release von Mg^{++} als Funktion der Zeit dargestellt.

Die Bindung von Mn^{++} übersteigt bei weitem den Release von Mg^{++} , darüber hinaus ist der Release von Mg^{++} zeitlich konstant. Dies legt die Vermutung nahe, daß Mn^{++} nur oberflächlich gebundenes Mg^{++} in einer schnellen ionischen Reaktion freisetzt.

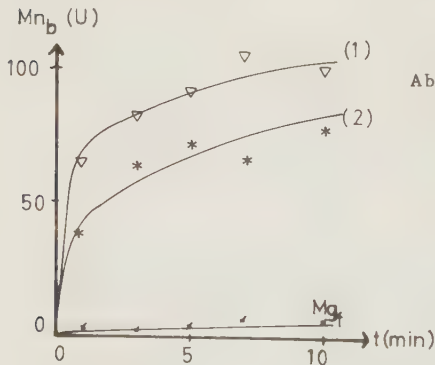


Abb. 2.3: Mn-Bindung und Mg-Release in Abhängigkeit von der Zeit

- (1) Bindung ohne EDTA-Stop
- (2) Bindung mit EDTA-Stop

Die Zugabe von Ca^{++} und Mg^{++} vor bzw. nach der Inkubation mit Mn^{++} führt im Gegensatz zu Mg^{++} zu einer Bindungsabnahme bzw. Freisetzung von Mn^{++} (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Konkurrenz zwischen Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++}

	$\text{Mn}_b(\text{U})$	$\Delta \text{Mn}_b(\text{U})$
$\text{Ca} \xrightarrow{4'} {}^{54}\text{Mn} \xrightarrow{10'} \text{EDTA}$	64	15
$\text{Mg} \xrightarrow{4'} {}^{51}\text{Mn} \xrightarrow{10'} \text{EDTA}$	77	2
Kontrolle: ${}^{54}\text{Mn} \xrightarrow{10'} \text{EDTA}$	79	--

1 ml RLM 5mg/ml, $\text{Ca} = \text{Mn} = \text{Mg} = 100\text{U}$; $\text{EDTA} = 300\text{U}$

Besonders deutlich läßt sich das kompetitive Verhalten zwischen den Ionen Mn^{++} und Ca^{++} in einem anderen Bindungsexperiment darstellen (Abb. 2.4).

Eine Erhöhung der Ca^{++} -Konzentration unter gleichzeitiger Konstanzhaltung der Summe beider Konzentrationen führt zu einem Rückgang der Mn^{++} -Bindung und umgekehrt. Die Summe der Bindung aus Mn_b^{++} und Ca_b^{++} , dargestellt durch die jeweils links stehende Säule, bleibt nahezu konstant; ein wichtiger Hinweis, daß Ca^{++} und Mn^{++} sich an ihren Bindungsstellen in der Membran gegenseitig ersetzen können.

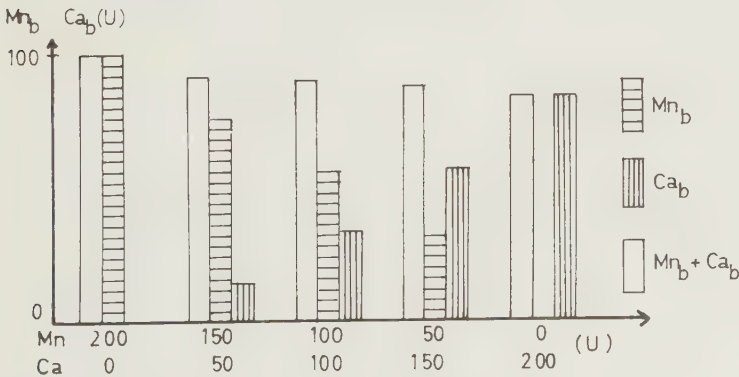


Abb. 2.4: Konkurrenz zwischen Ca und Mn

In Abb. 2.5 ist das Ergebnis eines Versuchs dargestellt, wie er teilweise von Lehninger (5) beschrieben wurde.

Man beobachtet die Sauerstoffaufnahme einer Mitochondrien-Suspension in Gegenwart des Substrates Succinat, aber ohne ADP. Zugabe von Ca^{++} (zum Zeitpunkt (1)) induziert eine kurze Atmungsstimulierung durch Oberflächenbindung des Ca^{++} . Da alle Bindungsplätze besetzt sind, kann die 2. Zugabe von Ca^{++} (2) keine Stimulierung mehr erzeugen. Erst die Zugabe von PO_4 verursacht eine weitere schnelle Sauerstoffaufnahme: Das oberflächlich angebundene Ca^{++} wird nun zusammen mit PO_4 unter Energieaufnahme (Sauerstoffverbrauch) mittels des von Lehninger postulierten Ca^{++} -Carriers in den Matrixraum der Mitochondrien transportiert (5,11).

Wie man der Abb. 2.5 entnimmt, sind diese gerade beschriebenen Effekte - wenn auch nicht so ausgeprägt - auch bei Mn^{++} , aber nicht bei Mg^{++} zu beobachten.

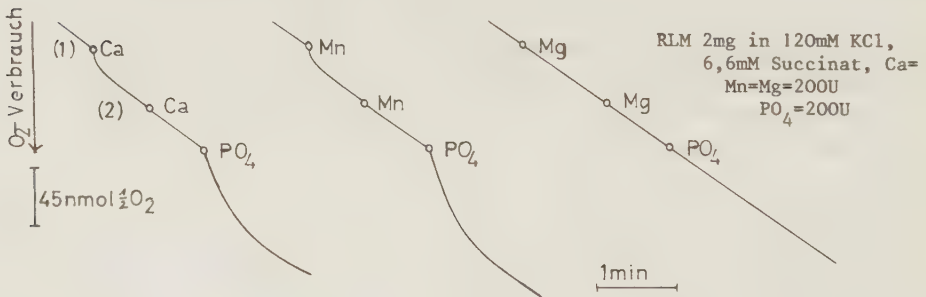


Abb. 2.5: Stimulierung der $\frac{1}{2} \text{O}_2$ Aufnahme durch Ca, Mn, Mg

2.4. Inhibierung und Reversibilität der Mn^{++} -Bindung

Reynafarje und Lehninger (11) postulierten aufgrund ihrer Experimente an RLM, deren Atmung durch Antimycin A und Rotenon inhibiert war, 2 Arten von Ca^{++} -Bindungsstellen:

- a) Die high affinity sites binden $1 \text{ nmol/mg } Ca^{++}$ mit einer Affinitätskonstanten $K = 1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Diese "high affinity"-Bindung wird durch 20 U DNP und andere Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung inhibiert.
- b) Die low affinity sites binden etwa 40 U mit $K = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Diese "high affinity"-Bindungsorte sind nach Carafoli (12,3) mit dem Ca^{++} -Carrier identisch. Gestützt wird diese These u.a. durch die Tatsache, daß etwa 4 U Ruthenium Red oder La^{+++} ausreichend sind, um jeglichen Ca^{++} -Transport zu unterbinden. (13,14)

Eine eindeutige Zuordnung der "low affinity"-Bindung zu bestimmten Membranbereichen wurde bis heute von der Literatur nicht gegeben. Einen Beitrag hierzu versucht die vorliegende Arbeit zu geben.

In Abb. 2.6 ist der Einfluß der Atmungsinhibitoren Antimycin A, Rotenon sowie von Ruthenium Red und La auf die Mn^{++} -Bindung dargestellt.

Trotz Zugabe von EDTA, welches eine Oberflächenbindung von Mn^{++} verhindert, ermöglichen diese Inhibitoren eine Restbindung von $< 30 \%$. Zur Erklärung dieses Verhaltens muß man einen unspezifischen Transport (durch Poren?) von Mn^{++} annehmen. Wie die in Abschnitt 5.4.2 beschriebenen ESR-Untersuchungen ergaben, kann das in Gegenwart von DNP, RR, AA + Rotenon, La gebundene Mn^{++} dem Matrixraum der Mitochondrien zugeordnet werden.

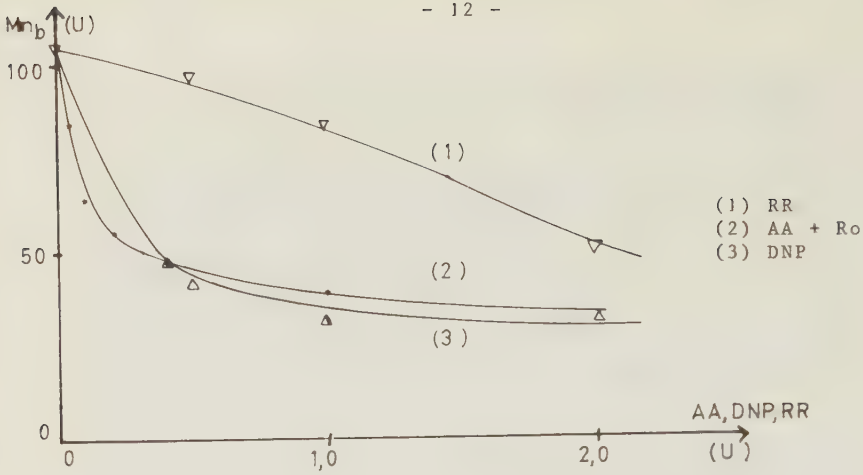


Abb.2.6: Einfluß von Antimycin A + Rotenon, DNP, Ruthenium Red auf die Mn-Bindung

Von großer Bedeutung für die Interpretation der ESR-Daten ist die Reversibilität der Mn^{++} -Bindung in Gegenwart von DNP.

Chappel (15) konnte aus ESR-Messungen am nicht gebundenen Mn^{++} (= Intensitätsbeobachtung des Mn-Sextetts in Gegenwart von Mitochondrien) schließen, daß die Zugabe von DNP zu Mn^{++} beladenen Mitochondrien zu einer raschen Freisetzung von Mn^{++} führt. Dieser Release unterbleibt in Gegenwart von PO_4 . Dieses Verhalten soll im folgenden Experiment dargestellt werden.

Tabelle 2.2: Irreversibilität der Mn^{++} -Bindung in Gegenwart von PO_4

	$Mn_b (U)$	$\Delta Mn_b (U)$
$^{54}Mn \xrightarrow{10'} EDTA + DNP \xrightarrow{5'}$	61	12
$^{54}Mn \xrightarrow{10'} EDTA$	73	--
$^{54}Mn + PO_4 \xrightarrow{10'} EDTA + DNP \xrightarrow{5'}$	157	0
$^{54}Mn + PO_4 \xrightarrow{10'} EDTA$	157	--

Die Präsenz von PO_4 stimuliert die Mn^{++} -Bindung und ist bezüglich DNP und anderen Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung irreversibel.

2.5. Stimulierung der Mn^{++} Bindung durch PO_4

Wie schon bei den Untersuchungen mit der Sauerstoffelektrode gezeigt und wie schon von Lehninger (5,16) beschrieben, stimuliert PO_4 die Bindung von Ca^{++} und Mn^{++} an die Mitochondrien. Da die RLM einen endogenen PO_4 -Gehalt von der Größenordnung 10 U aufweisen, lag die Vermutung nahe, daß die Mn^{++} -Bindung in Abwesenheit von PO_4 durch endogenes PO_4 stimuliert oder gar erzeugt würde!

Um den Anteil der Mn^{++} -Bindung durch endogenes PO_4 an der Gesamt- Mn^{++} -Bindung zu ermitteln wurde das folgende Experiment durchgeführt:

Man bestimmt gleichzeitig die Bindung von Mn^{++} und PO_4 und vergleicht sie mit den Kontrollexperimenten ohne PO_4 bzw. ohne Mn^{++} .

Tabelle 2.3: Wechselseitige Stimulierung der Mn^{++} -und PO_4 -Bindung

	Mn_b (U)	PO_{4b} (U)
$^{54}\text{Mn} \xrightarrow{10'} \text{EDTA}$	79	--
$\text{PO}_4 \xrightarrow{10'} \text{EDTA}$	--	0
$\text{PO}_4 + ^{54}\text{Mn} \xrightarrow{10'} \text{EDTA}$	180	120

0,5ml RLM 5mg/ml, $\text{Mn} = \text{PO}_4 = 200\text{U}$ EDTA = 400U pH 7,2 22°C

Die Gegenwart von 200 U PO_4 bewirkt demnach eine Bindungserhöhung von $\Delta \text{Mn}_b = 91$ U, d.h. der Quotient aus ΔPO_4 und ΔMn^{++} beträgt $\Delta \text{PO}_4 / \Delta \text{Mn} = 1,3$. Bei einem RLM Gehalt von 10 U PO_4 könnten demnach höchstens 7,5 U Mn gebunden werden. Der prozentuale Anteil dieses Mn-Anteils an der Gesamtbindung wäre somit nur 8 %!

2.6. Mn^{++} -Bindung als Funktion von pH, Protein-, Mn^{++} -Konzentration

Um die für die ESR-Messungen optimalen Bindungsverhältnisse für Mn^{++} zu ermitteln, mußten die drei Parameter pH, Protein, Mn^{++} -Konzentration variiert werden. Dabei ist folgendes zu beachten:

- a) Die in Abschnitt 2.2 beschriebenen Untersuchungen hinsichtlich der Atmungskontrolle und des Schwellen-Schrumpfen-Verhaltens der Mitochondrien limitieren die Menge des eingesetzten Mn^{++} auf Werte kleiner 200 U.
- b) Die Messungen im Q-BAND erfordern aus Empfindlichkeitsgründen (Abschnitt 4.1) höhere Endkonzentrationen an gebundenem Mn^{++} als bisher üblich.
- c) Zugabe von höheren Mn^{++} -Konzentrationen verschieben aber infolge der Acidität der MnCl_2 -Lösung den durch TRAP eingestellten pH von 7.2. Darüber hinaus setzt die Komplexierungs-Reaktion zwischen EDTA und Mn^{++} weitere Protonen frei. (15)

Abb. 2.7 zeigt die Bindung von Mn^{++} an RLM als Funktion der Zeit. Nach 10 Min. ist die Sättigung erreicht.

Aus Abb. 2.8 ergibt sich, daß die Gesamtbindung von Mn^{++} unabhängig von der eingesetzten Mn^{++} -Konzentration 100 U nicht überschreiten kann. So wird fortan mit einer Mn^{++} -Konzentration von ≤ 200 U experimentiert.

Aus der in Abb. 2.9 dargestellten pH-Abhängigkeit der Mn^{++} -Bindung entnimmt man das Optimum bei $\text{pH} = 7.2$.

Schließlich zeigt Abb. 2.10, daß die Mn^{++} -Bindung unabhängig von der Konzentration der eingesetzten Mitochondrien-Suspension ist. Damit kann ausgeschlossen werden, daß Mn^{++} bei hohen Proteinkonzentrationen zwischen den Mitochondrien eingeschlossen wird!

Die Aufnahme von Mn^{++} durch die Mitochondrien ist somit proportional zur Proteinkonzentration. Im Q-BAND werden Proteinkonzentrationen bis 80 mg/ml notwendig, um einen hohen Mn^{++} -Gehalt zu erreichen!

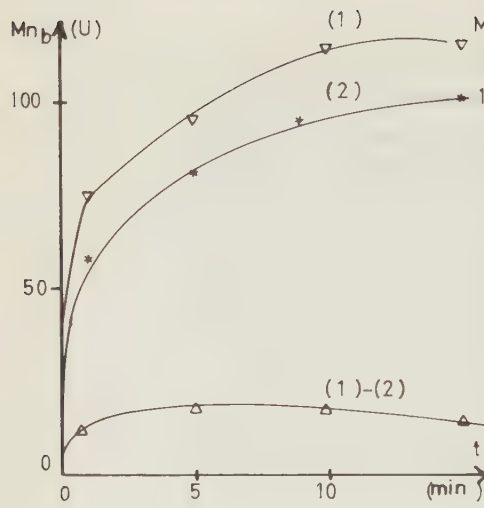


Abb. 2.7: $Mn_b = f(t)$

(1) Bindung ohne EDTA-Stop
(2) Bindung mit EDTA-Stop

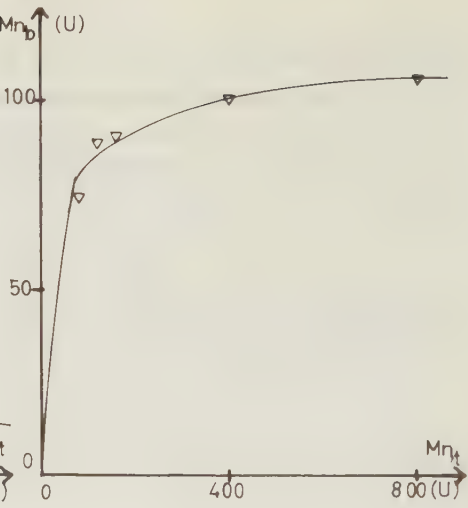


Abb. 2.8: $Mn_b = f(Mn_t)$

$Mn_t = 200$ U

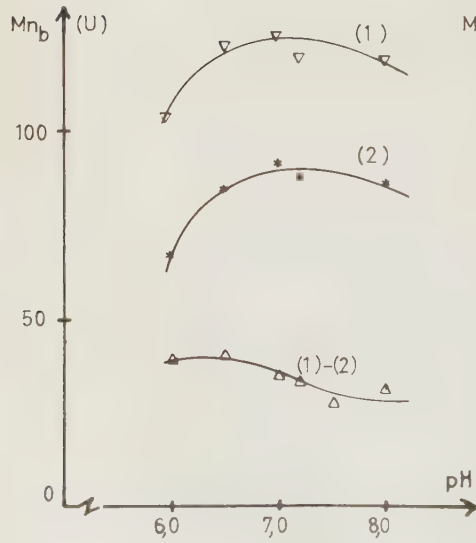


Abb. 2.9: $Mn_b = f(pH)$

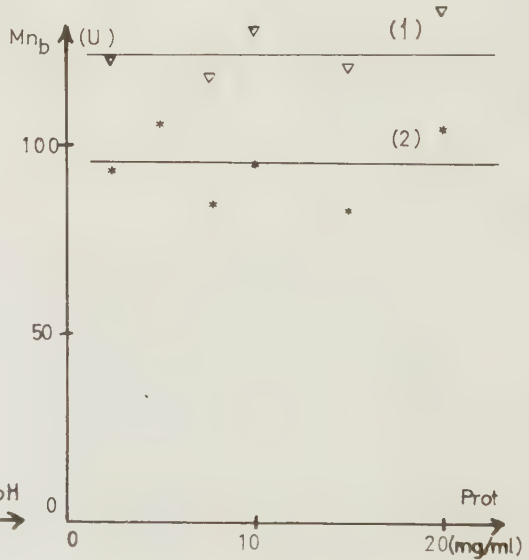


Abb. 2.10: $Mn_b = f(Prot)$

3. Das ESR-Spektrum des Mn^{++} -Ions

Im folgenden Abschnitt sollen kurz die wichtigsten Grundlagen zum Verständnis der Mn^{++} -Spektren im X- und Q-BAND beschrieben werden.

Das freie Mn^{++} -Ion besitzt wegen seiner fünf 3d Elektronen einen $6S_{5/2}$ Grundzustand. In einem Kristallfeld kubischer Symmetrie, welches z.B. durch eine oktaedrische Anordnung von 6 H_2O Liganden erzeugt wird, muß die sechsfache Spinentartung, gruppentheoretischen Überlegungen folgend (17), aufgehoben werden. Dies äußert sich im Spin-Hamilton-Operator durch die Hinzunahme eines Terms 4. Ordnung in den Operator-Komponenten $\hat{S}_x$, $\hat{S}_y$, $\hat{S}_z$. In der Folge spaltet der Grundzustand in ein Quartuplett und ein tiefer liegendes Dublett auf.

Da die experimentell beobachtbare Feinstruktur nicht in Übereinstimmung mit dieser Aufspaltung ist, muß angenommen werden, daß die oktaedrische Symmetrie des Ligandenfeldes durch eine tetragonale und rhombische Verzerrung erniedrigt ist. Diese Symmetrierniedrigung bedingt die Aufspaltung des Grundzustandes in drei zweifach entartete Energieniveaus. Zur quantenmechanischen Beschreibung dieser quadratischen Nullfeldaufspaltung benötigt man die beiden Parameter D und E, die axialen- bzw. rhombischen Verzerrungsparameter.

Als physikalische Ursachen für die quadratische Nullfeldaufspaltung müssen die Spin-Bahn- und Dipol-Dipol-Wechselwirkung der fünf 3d Elektronen angesehen werden. Diese Wechselwirkungen werden störungsrechnerisch in höherer als 1. Ordnung berücksichtigt und bestimmen zusammen mit der Symmetrie des Kristallfeldes die Größe der Parameter D und E.

Berücksichtigt man die Hyperfein-Wechselwirkung zwischen den magnetischen Momenten von Elektronenspin und Kernspin ($I=5/2$), so erhält man den folgenden Spin-Hamilton-Operator:

$$\mathcal{H} = g \beta \hat{H} \hat{S} + A \hat{S} \hat{I} + D (\hat{S}_z^2 - 1/3(S+1)S) + E (\hat{S}_x^2 - \hat{S}_y^2) + 1/6a (\hat{S}_x^4 + \hat{S}_y^4 + \hat{S}_z^4)$$

Zeemanterm		quadratische Nullfeldaufspaltung	
Hyperfein	WW	Term 2. Ordnung	Term 4. Ordnung

β : Bohrsches Magneton

g : Spektroskopischer
Aufspaltungsfaktor

A : Hyperfein-Kopplungskonstante

Da der ^6S -Grundzustand keinen Bahndrehimpuls hat, darf man sowohl für den spektroskopischen Aufspaltungsfaktor g als auch für die Hyperfein-Kopplungskonstante ein isotropes Verhalten annehmen.

In Abb. 3.1 ist die Aufspaltung des Grundzustandes durch das Kristallfeld und das Magnetfeld dargestellt. Bedingt durch die Orientierungsquantenzahl des Gesamtelektronen-Spinmoments M und diejenige des Kern-Spinmoments m ergeben sich 30 Energieniveaus.

$$M = -5/2, -3/2, -1/2, 3/2, 1/2, 5/2$$

$$m = -5/2, -3/2, -1/2, 1/2, 3/2, 5/2$$

Die Auswahlregeln $\Delta M = \pm 1$ und $\Delta m = 0$ bestimmen die 30 möglichen ESR-Übergänge $|M-1, m\rangle \leftrightarrow |M, m\rangle$.

Sind die Parameter D, E, a, g, A bekannt, so können die Positionen der 30 Absorptionslinien bei gegebenem Magnetfeld berechnet werden. Hurd (18) hat diese Berechnungen störungstheoretisch bis zur 4. Ordnung durchgeführt.

So ergibt Mn^{++} in Einkristallen von CaCO_3 ein Spektrum von 30 Linien, welches sich über einen Feldbereich von 1100 Gs erstreckt. Die Linienorte sind abhängig von der Orientierung der Kristallachsen bezüglich des Magnetfeldes.

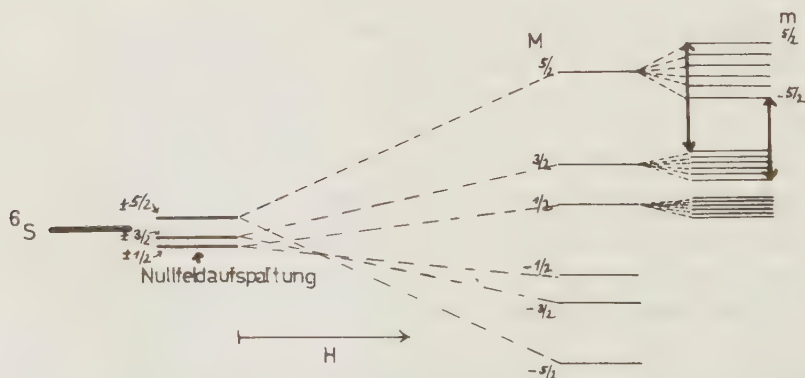


Abb. 3.1: Aufspaltung des Grundzustandes von Mn^{++} durch Kristallfeld und Magnetfeld

Die Linienbreiten der ESR-Signale sind primär durch die Dipol-Dipol-Wechselwirkung der im Kristall benachbarten paramagnetischen Mn^{++} -Ionen bestimmt. Sind die Abstände der Ionen in der Größenordnung einiger Angström, so tritt Austauschwechselwirkung ein. In der Folge kann die Dipol-Dipol-Wechselwirkung herausgemittelt und die Linienbreite dadurch drastisch vermindert werden.

Unter der Voraussetzung eines isotropen spektroskopischen Aufspaltungsfaktors g trägt die Austausch-Wechselwirkung den folgenden Term zum Spin-Hamilton-Operator bei:

$$\hat{H}_a = J \cdot \hat{S}_1 \cdot \hat{S}_2 \qquad \omega_e = J/\hbar$$

Das Austauschintegral J ist dabei abhängig vom Grad der Überlagerung der Wellenfunktionen der beiden wechselwirkenden Ionen. Die Austauschfrequenz ω_e ist demnach um so größer, je kleiner der Abstand der Ionen ist.

Wird ω_e größer als die Hyperfein-Aufspaltung (A), so verschwindet die Hyperfeinstruktur der Spektren, und es entsteht eine einzige Linie, deren Weite mit zunehmendem ω_e abnimmt ("exchange narrowing").

Das beschriebene Verhalten läßt sich besonders gut an $MnCl_2$ in Schmelzen von Alkali-Halogeniden verfolgen (19).

Nach Anderson (20) kann die durch Austausch-Wechselwirkung entstehende Linienform durch eine Lorentzlinie beschrieben werden.

3.1. Relaxation von Mn^{++} in wäßrigen Lösungen

Vergleicht man die ESR-Spektren von Mn^{++} in Einkristallen mit den Spektren von Mn^{++} in isotropen Flüssigkeiten, so ergeben letztere weit weniger strukturelle Information.

Durch die statistischen Bewegungen des Mn^{++} -Komplexes werden alle von seiner Orientierung abhängigen Wechselwirkungen herausgemittelt. Die beobachtbaren Übergänge werden allein durch den 1. und 2. Term des Hamilton-Operators bestimmt. In der Folge koinzidieren die fünf Feinstrukturlinien nahezu zu einer Linie, welche (21), bedingt durch die Hyperfeinstruktur, das bekannte "Mn-Sextett" ergibt.

Informationen über die Struktur der molekularen Umgebung des Mn^{++} -Ions lassen sich im Fall der Flüssigkeits-Spektren nur aus der Beobachtung der Linienbreite $\Delta\omega$ gewinnen.

Wie in Abschnitt 3.4.2 gezeigt wird, stellt $\Delta\omega = 1/T_2$ eine für die vorliegende Arbeit sinnvolle Annahme dar.

Ursache der durch T_2 beschreibbaren Relaxation ist die zeitliche Modulation der oben beschriebenen Nullfeldaufspaltung durch die Brownsche Molekularbewegung des Mn^{++} -Komplexes.

Im Falle des $Mn(H_2O)_6^{++}$ -Komplexes mit seiner kubischen Ligandenanordnung kann eine quadratische Nullfeldaufspaltung nur dann auftreten, wenn der Komplex infolge von Kollisionen statistisch verzerrt wird (22). Die diesen Vorgang beschreibende Korrelationszeit ist τ_v .

Wird die Symmetrie des oktaedrischen Ligandenfeldes durch Anlagerung von Mn^{++} an Proteine oder Moleküle erniedrigt, so wird die Relaxation im wesentlichen durch die Modulation der quadratischen Nullfeldaufspaltung infolge der Rotation des Komplexes bestimmt. Die entsprechende Rotationskorrelationszeit τ_r wird nach Luckhurst (22) mit τ_v zu τ_c zusammengefaßt:

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_r} + \frac{1}{\tau_v}$$

Die aus dem Term 4. Ordnung resultierende Relaxation gibt in jedem Fall nur einen kleinen Beitrag zur theoretisch berechenbaren Linienbreite (22).

Im folgenden Abschnitt soll nun der Übergang von den hier skizzierten physikalischen Ursachen der Relaxation zur Berechnung von experimentell beobachtbaren Linienbreiten beschrieben werden. Ein wesentliches Bindeglied ist dabei die Redfieldsche Relaxationstheorie (23).

3.2 Redfieldsche Relaxationstheorie und ihre Anwendung auf Mn^{++}

Die Redfieldsche Theorie (23) wurde entwickelt, um die Linienformen komplexer Spektren theoretisch zu berechnen sowie T_1 und T_2 in direkten Zusammenhang mit den statistischen, zeitabhängigen Störungen, verursacht durch das umgebende Medium, zu bringen.

Grundlage der Redfieldschen Relaxationstheorie ist der Formalismus der Dichtematrix (24).

Die Dichtematrix $\hat{\rho}$ ermöglicht die Berechnung des Erwartungswertes einer physikalischen Größe (z.B. die x-Komponente der Magnetisierung) in einer Gesamtheit von mikroskopischen Systemen. Dabei ist es nicht nötig, den Zustand eines einzelnen Systems zu kennen.

In der quantenmechanischen Beschreibung berechnet sich der Erwartungswert einer physikalischen Größe $\langle O \rangle$ nach:

$$(1) \quad \langle O \rangle = \int \psi^* \hat{O} \psi d\tau = \langle \psi | \hat{O} | \psi \rangle$$

$\hat{O}$ ist der einer physikalischen Größe zugeordnete Operator.

Die den Zustand des Ions beschreibende Wellenfunktion kann nach den Eigenfunktionen des zugeordneten Hamilton-Operators entwickelt werden:

$$(2) \quad \psi = \sum_k c_k(t) \cdot \phi_k$$

Bildet man den Mittelwert der Erwartungswerte aller Mitglieder eines Ensembles, so erhält man:

$$(3) \quad \langle \bar{O} \rangle = \sum_{k,j} \overline{c_k c_j^*} \langle \phi_j | \hat{O} | \phi_k \rangle$$

Hieraus leitet sich die Definition der Dichtematrix ab:

$$(4) \quad \rho_{kj} = \overline{c_k c_j^*}$$

Liegt keine zeitabhängige Störung vor, dann gibt ρ_{kk} die Wahrscheinlichkeit an, mit der der Zustand ϕ_k besetzt ist. Im thermischen Gleichgewicht müssen alle Nicht-Diagonalelemente von $\hat{\rho}$ Null sein!

Die Definition der Dichtematrix führt nun zusammen mit (3) zur zentralen Gleichung der Dichtematrixtheorie:

$$(5) \quad \langle \bar{O} \rangle = \text{Spur} (\hat{\rho} \cdot \hat{O})$$

Gleichung (5) sichert die Berechenbarkeit eines jeden durch einen Operator darstellbaren Erwartungswertes des Ensembles, bei alleiniger Kenntnis der Matrixelemente von $\hat{S}$ und $\hat{O}$

Die Berechnung der Matrixelemente von $\hat{S}$ bereitet dabei die größten Schwierigkeiten. Zunächst gilt für S_{KJ} die folgende Bewegungsgleichung:

$$(6) \quad \left(\frac{dS}{dt} \right)_{KJ} = \frac{i}{\hbar} (S \cdot \mathcal{H} - \mathcal{H} \cdot S)_{KJ} \quad \text{mit: } \hat{\mathcal{H}} = \hat{\mathcal{H}}_0 + \hat{\mathcal{H}}(t)$$

Wird nun die Wechselwirkung des quantenmechanischen Systems mit seiner Umgebung durch eine zeitabhängige statistische Störung $\hat{H}(t)$ des Hamilton-Operators $\hat{H}_0$ beschrieben, und geht man mit $\hat{\mathcal{H}} = \hat{\mathcal{H}}_0 + \hat{\mathcal{H}}(t)$ in Gleichung (6) ein, so erhält man nach einer Störungsrechnung (23):

$$(7) \quad \left(\frac{dS}{dt} \right)_{aa'} = \frac{i}{\hbar} (E_{a'} - E_a) S_{aa'} + \sum_{bb'} R_{aa'bb'} S_{bb'}$$

a, a', b, b' und $E_a, E_{a'}, E_b, E_{b'}$ sind die Eigenfunktionen und Eigenwerte von $\hat{H}_0$: $\omega_{a,a'} = (E_a - E_{a'})/\hbar$

Die Elemente der Redfield'schen Relaxationsmatrix $R_{aa'bb'}$ sind Linearkombinationen der Fouriertransformierten der sogenannten Autokorrelationsfunktion G

$$(8) \quad G(\tau) = \overline{\mathcal{H}(t-\tau) \mathcal{H}(t)}$$

$$G_{aba'b'} = \overline{\langle a | \mathcal{H}(t-\tau) | b \rangle \langle b' | \mathcal{H}(t) | a' \rangle}$$

Der Querstrich deutet die Mittelung über alle Mitglieder des quantenmechanischen Ensembles an. Man nimmt an, daß $\hat{H}(t)$ für jedes Mitglied zum gleichen Zeitpunkt einen anderen Wert annimmt. Außerdem wird angenommen, daß es sich um einen stationären statistischen Prozeß handelt, der nur von der Zeitdifferenz $\tau = t_2 - t_1$ abhängig ist.

Mit Gleichung (8) lassen sich nun die Elemente der Redfield'schen Relaxationsmatrix angeben.

$$(9) \quad R_{aa'bb'} = \frac{1}{\hbar^2} \left\{ J_{aba'b'}(\omega_{ab}) + J_{bba'a'}(\omega_{b'a'}) - \delta_{ab} \sum_c J_{bca'c}(\omega_{b'c}) - \delta_{a'b'} \sum_c J_{acbc}(\omega_{cb}) \right\}$$

$$(10) \quad J_{aba'b'}(\omega_{ab}) = \int_0^\infty G_{aba'b'}(\tau) \exp(-i \omega_{ab} \tau) d\tau$$

Wie weiter unten gezeigt wird, steht $R_{aa'bb'}$ in engem Zusammenhang mit $1/T_2$.

$R_{aa'bb'}$ kann als Übergangswahrscheinlichkeit pro Zeiteinheit für einen Übergang vom Zustand $|b\rangle$ in den Zustand $|a\rangle$ betrachtet werden.

Im Falle des Mn^{++} -Ions gibt es, sieht man zunächst von der Hyperfein-Wechselwirkung ab, 6 Eigenzustände $|5/2\rangle, |3/2\rangle, |1/2\rangle, |-1/2\rangle, |-3/2\rangle, |-5/2\rangle$.

Die Auswahlregel $\Delta M = \pm 1$ ermöglicht fünf Übergänge mit den Frequenzen $\omega_{aa'} = (E_a - E_{a'}) / h$.

Entsprechend diesen fünf Übergängen muß die Relaxationsmatrix eine 5×5 Matrix sein!

Zur Berechnung der Elemente von R bedarf es der Kenntnis der zeitabhängigen Störung des Hamilton-Operators. Zunächst sollen aber noch die Voraussetzungen der Redfield'schen Relaxationstheorie mitgeteilt werden, um zu übersehen, inwieweit diese Theorie auf die vorliegende Arbeit anwendbar ist.

Wesentliche Voraussetzung für die Gültigkeit von Gleichung (7) ist, daß die Elemente von R der folgenden Bedingung ("motional narrowing") gehorchen (23):

$$(11) \quad R_{aa'bb'} < \frac{1}{T_c}$$

T_c ist die Korrelationszeit der statistischen Störung.

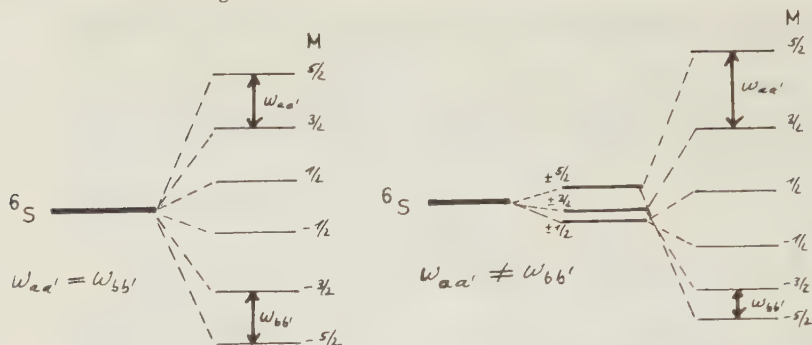
Entsprechend der Störungstheorie für entartete und nicht entartete Zustände müssen die beiden Fälle (a) und (b) unterschieden werden:

$$(a) \quad R_{aa'bb'} > \omega_{aa'} - \omega_{bb'}$$

$$(b) \quad R_{aa'bb'} < \omega_{aa'} - \omega_{bb'}$$

Fall (a) entspricht einer Überlagerung der Übergänge $|a\rangle \leftrightarrow |a'\rangle$ und $|b\rangle \leftrightarrow |b'\rangle$ innerhalb der Linienbreite der beiden Übergänge. Liegt eine n-fache Entartung des Grundzustandes vor, welche durch das Magnetfeld aufgehoben wird, so ergeben sich nach der Auswahlregel $\Delta M = \pm 1$ n-1 zusammenfallende ESR-Linien. Die unter (a) genannte Bedingung ist dann mit Sicherheit erfüllt.

Abb. 3.2: Einfluß der Nullfeldaufspaltung auf die ESR-Übergänge im Magnetfeld



(a) Ohne Nullfeldaufspaltung

Man erhält eine Absorptionslinie, die sich aus 5 Lorentzlinien zusammensetzt. Die Eigenwerte und Eigenvektoren der Relaxationsmatrix bestimmen die 5 Relaxationsraten und Intensitäten.

(b) Mit Nullfeldaufspaltung

Man erhält 5 Absorptionslinien. Liegt keine Überlagerung benachbarter Linien innerhalb ihrer Linienbreite vor, so werden die zugehörigen Relaxationsraten durch die Diagonalelemente der Relaxationsmatrix bestimmt.

Die Relaxationsraten und Intensitäten der einzelnen Übergänge ergeben sich im Fall (a) aus den Eigenwerten λ_M und Eigenvektoren $\vec{V}_M$ der Relaxationsmatrix (25).

$$(12) \quad \left(\frac{1}{T_2} \right) |M-1\rangle \leftrightarrow |M\rangle = -\lambda_M$$

$$(13) \quad (INT) \quad |M-1\rangle \leftrightarrow |M\rangle = \frac{(\vec{X} \cdot \vec{V}_M)^2}{\sum_{M=1}^5 (\vec{X} \cdot \vec{V}_M)^2} \quad \vec{X} = (\sqrt{5}, \sqrt{8}, \sqrt{9}, \sqrt{8}, \sqrt{5})$$

INT = Intensität des Übergangs

Die Ableitung der Gleichung (13) wird im Anhang III gegeben.

$\vec{X}$ ist ein Vektor, dessen Komponenten durch die Eigenwerte des Verschiebeoperators $\hat{S}_+ = \hat{S}_x + i\hat{S}_y$ bestimmt sind.

Die ESR-Linie ergibt sich dann aus der Superposition von n-1 Lorentzlinien mit den zugehörigen $1/T_2$ und INT.

Berücksichtigt man nun im Falle von Mn^{++} die Nullfeldaufspaltung, so wird dadurch die Entartung der fünf Feinstruktur-Übergänge aufgehoben, d.h. $\omega_{aa'} \neq \omega_{bb'}$. Die Hinzunahme der Hyperfein-Wechselwirkung bewirkt eine weitere Trennung der fünf Übergangsfrequenzen (vgl. Tab. 3.1).

Die Elemente der Relaxationsmatrix müssen nun mit den Eigenzuständen des Zeeman und Hyperfein-Wechselwirkungs-Terms des Hamilton-Operators berechnet werden (22). Die daraus resultierende Korrektur der Relaxationszeiten wirkt sich nach Goldammer (26) erst für $\tau_c > 2 \cdot 10^{-11}$ s aus und kann für unsere Messungen vernachlässigt werden.

Da die in Abschnitt 5.1 beschriebenen Matrixsignale eine gegenüber der Feinstrukturaufspaltung (5 Gs) große Linienbreite von 39 Gs aufweisen, erscheint es gerechtfertigt, die Simulation der beobachteten Spektren auf der Grundlage des Falles (a) zu behandeln, wie es auch andere Autoren (27,28) gemacht haben.

Im Fall (b) entspricht $R_{aa'bb'}$ einer nichtsäkularen Störung.¹ Alle Elemente $R_{aa'bb'}$, welche der Bedingung (b) unterworfen sind, werden mit der Zeit herausgemittelt.

Die Relaxationsraten der Übergänge $|a\rangle \leftrightarrow |a'\rangle$ sind dann durch die Diagonalelemente der Relaxationsmatrix $R_{aa'aa'}$ bestimmt. Wie Luckhurst (22) gezeigt hat, ist für die Beschreibung des $Mn(H_2O)_6^{++}$ -Spektrums weder Fall (a) noch Fall (b) zutreffend.

Zur Berechnung der $Mn(H_2O)_6^{++}$ -Spektren bei 90°C muß die Linienform durch ein Verfahren bestimmt werden, das von Binsch (29) für NMR - Linien entwickelt wurde.

3.3 Berechnung der Elemente der Relaxationsmatrix

Wie in Abschnitt 3.2 ausgeführt, sind die Elemente der Relaxationsmatrix abhängig von der Art der durch $\hat{H}(t)$ beschriebenen statistischen Störung des Hamilton-Operators $\hat{H}_0$.

1: Nichtsäkulare Störung: Die Differenz der Energien der Eigenzustände ist größer als die Störung des quantenmechanischen Systems.

Im Falle des Mn^{++} -Ions wird die zeitabhängige Störung durch die zeitliche Modulation des Feinstrukturterms infolge der Brownschen Molekularbewegung erzeugt.

$$(14) \quad \hat{H}(t) = D(t) \cdot (\hat{S}_z^2 - 1/3 (S+1)S) + E(t) \cdot (\hat{S}_x^2 - \hat{S}_y^2)$$

Eine wesentliche Vereinfachung in der Berechnung der $R_{aa'bb'}$ ergibt sich durch die Einführung von irreduziblen Tensoroperatoren (22).

$$(15) \quad \hat{H}(t) = \sum_{L,q} (-1)^p F^{(L,q)} D_{qp}^L(t) \hat{T}^{(L,-p)}$$

Der Tensor $T^{(L,-p)}$ repräsentiert die Spinoperatoren der quadratischen Nullfeldaufspaltung (Gleichung 14), bezogen auf das Laborsystem.

$$(16) \quad \begin{aligned} T^{(2,0)} &= (1/6)^{1/2} \left\{ 3 \hat{S}_z^2 - S(S+1) \right\} \\ T^{(2,\pm 1)} &= \mp 1/2 \left\{ \hat{S}_+ \hat{S}_z + \hat{S}_z \hat{S}_+ \right\} \\ T^{(2,\pm 2)} &= 1/2 \hat{S}_{\pm}^2 \end{aligned}$$

$F^{(L,q)}$ ist der Tensor der entsprechenden räumlichen Variablen im Koordinatensystem des Komplexes.

$$(17) \quad \begin{aligned} F^{(2,0)} &= (2/3)^{1/2} D \\ F^{(2,\pm 1)} &= 0 \\ F^{(2,\pm 2)} &= E \end{aligned}$$

Die zeitabhängige Wignersche Rotationsmatrix verknüpft die beiden Koordinatensysteme.

Mit den Eigenvektoren $|M\rangle$ des Zeemanterms des Spin-Hamilton-Operators und unter Zuhilfenahme des Wigner-Eckart-Theorems sowie von Gleichung (9) sind die Elemente $R_{aa'bb'}$ nun auf direktem Weg berechenbar. Nach Luckhurst (22) erhält man:

$$(18) \quad R_{aa'bb'} = \begin{pmatrix} A & D & E & O & O \\ D & B & O & F & O \\ E & O & C & O & E \\ O & F & O & B & D \\ O & O & E & D & A \end{pmatrix} \frac{\Delta^2}{10}$$

$$\begin{aligned} A &= 24 J_0 + 48 J_1 + 28 J_2 \\ B &= 6 J_0 + 36 J_1 + 46 J_2 \\ C &= 16 J_1 + 56 J_2 \\ D &= -8 \sqrt{10} J_1 \\ E &= -12 \sqrt{5} J_2 \\ F &= -36 J_2 \end{aligned}$$

$$J_k = 2 \tau_c / (1 + k^2 \omega_0^2 \tau_c^2); \quad \Delta^2 = 2/3 D^2 + 2 E^2;$$

ω_0 : Elektronen-Resonanzfrequenz im Feld H_{oz} .

τ_c : Korrelationszeit als Maß für die statistischen Bewegungen des Mn^{++} -Komplexes.

3.4 Berechnung und Simulation des Mn^{++} -Spektrums in wäßrigen Lösungen

Ziel der Berechnung der Mn^{++} -Spektren ist ihre Simulation in Abhängigkeit von den beiden Parametern τ_c und Δ .

Der qualitative Vergleich dieser simulierten Spektren im X- und Q-BAND gibt dann Kriterien zur Zerlegung der mitochondrialen Mn^{++} -Spektren (Abschnitt 4.2).

Darüber hinaus kann aus dem Vergleich der im Matrixraum beobachtbaren Spektren im X- und Q-BAND auf die Parameter τ_c und Δ geschlossen werden.

Die Berechnung der Spektren erfordert neben der Kenntnis der durch $R_{aa'bb'}$ bestimmten Intensitäten und Linienbreiten der einzelnen Übergänge auch deren Positionen bei vorgegebenem Magnetfeld H_{oz} .

So ergibt die Aufspaltung der drei Feinstrukturdoublets im H-Feld nach Abb. 3.1 36 Energieniveaus.

Die Positionen der 30 erlaubten ESR-Übergänge bei vorgegebenem Magnetfeld H_{oz} können nach der in der Arbeit von Hurd (18) angegebenen Formel berechnet werden.

$$H(M, m) = H_{OZ} - A \cdot m - \frac{A^2 C_2}{2(H_{OZ} - Am)} - \frac{A^4 C_4}{8(H_{OZ} - Am)^3}$$

$$(19) \quad C_2 = 35/4 - m^2 + m(2M-1)$$

$$C_4 = (4M^3 - 6M^2 + 4M-1)(25m - m^3) + (3M^2 - 3M+1)(m^4 - 44m^2 + 312) + (2M-1)(44-351m) - (25m^4 - 351m^2 - 1644);$$

Um eine Übereinstimmung zwischen den beobachteten und simulierten Spektren zu erreichen, wurde in dieser Arbeit der Hyperfein-Kopplungskonstanten der Wert $A = 93$ Gs zugewiesen.

In Tabelle 3.1 sind alle 30 Resonanzfeldstärken für das X- und Q-BAND, berechnet nach Gleichung (19), angegeben. Dort ergibt sich auch zwanglos die folgende Zuordnung:

$$\text{Feldkoordinaten } H_O^n: = H(M, m) \quad n = 1..30$$

Die zur ersten Gruppe der Resonanzfeldstärken ($m = 5/2$) gehörigen Relaxationsraten und Intensitäten werden aus den Eigenwerten und Eigenvektoren der Relaxationsmatrix (Gleichungen 12, 13, 18) berechnet. Sie können auf die restlichen Gruppen (vgl. Tabelle 3.1) übertragen werden.

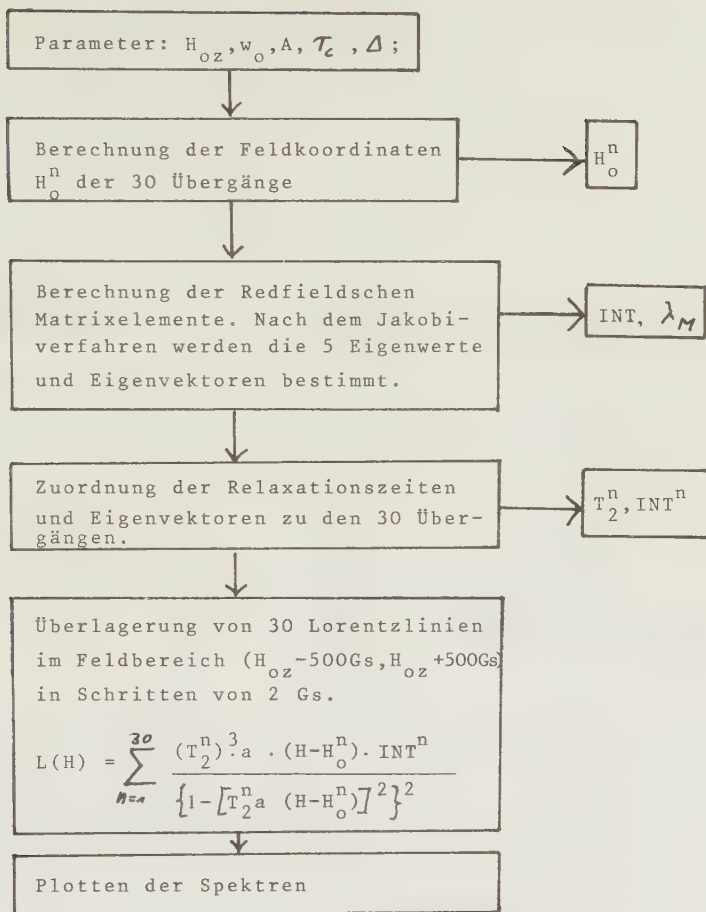
Das gesuchte Spektrum ergibt sich dann aus der Überlagerung von 30 derivierten Lorentzlinien:

$$L(H) = \sum_{n=1}^{30} L_n(H) \quad L_n(H) = \frac{(T_2^n)^3 a \cdot (H - H_O^n) \cdot \text{INT}^n}{\{1 - [T_2^n a (H - H_O^n)]^2\}^2}$$

$$a = 3,05 \cdot 10^{14} \frac{1}{s^2 \text{Gs}^2}$$

a dient der Umrechnung von Frequenzeinheiten in Feldeinheiten.

Im folgenden soll anhand eines Flußdiagramms der Ablauf des am LRZ-München gerechneten ALCOL-60 Programms (siehe auch Anhang I) zur Berechnung und zum Plotten der Mn^{++} -Spektren aufgezeigt werden.



3.4.1 Feldkoordinaten der Übergänge im X- und Q-BAND

Tabelle 3.1: Feldkoordinaten der 30 ESR-Übergänge

m	M	H_o^n (Gs) X-BAND	H_o^n (Gs) Q-BAND
5/2	5/2	3 150	12 563
	3/2	3 157	12 565
	1/2	3 163	12 567
	-1/2	3 170	12 568
	-3/2	3 176	12 570
3/2		3 243	12 656
		3 247	12 657
		3 251	12 658
		3 255	12 659
		3 258	12 660
1/2		3 339	12 750
		3 341	12 750
		3 342	12 751
		3 343	12 751
		3 344	12 751
-1/2		3 437	12 844
		3 436	12 844
		3 435	12 844
		3 434	12 843
		3 432	12 843
-3/2		3 538	12 939
		3 534	12 938
		3 531	12 937
		3 528	12 936
		3 523	12 935
-5/2		3 640	13 035
		3 635	13 033
		3 629	13 032
		3 623	13 030
		3 617	13 028

X-BAND

$$H_o = 3400 \text{ Gs}$$

$$\gamma_o = 9,52 \text{ GHz}$$

Q-BAND

$$H_o = 12800 \text{ Gs}$$

$$\gamma_o = 35,8 \text{ GHz}$$

Man entnimmt der Tabelle 3.1, daß die Übergänge der 4. Gruppe, wie schon von Garret (30) beschrieben, weit dichter liegen als diejenigen der 1. Gruppe! Trotzdem zeigen die simulierten Spektren keine Verbreiterung der 1. Linie gegenüber der 4. Linie, wie im nächsten Abschnitt gezeigt wird.

Die Spektren im X- und Q-BAND müssen sich bedingt durch die Wahl der Hyperfeinstrukturkonstanten $A=93$ Gs und die Linienverbreiterung über einen Bereich von größer 465 Gs erstrecken. Jedes Mn^{++} -Spektrum kleinerer Ausdehnung, wie es in Abschnitt 5.1. beschrieben wird, kann nur durch eine Austausch-Wechselwirkung erklärt werden (vgl. Abschnitt 5.3).

3.4.2 Relaxationsraten und Intensitäten der ESR-Übergänge

Bestimmt man nach den Gleichungen (12) und (13) die Relaxationsraten und Intensitäten der fünf Feinstrukturübergänge, so ergibt sich, daß sie nur jeweils drei unterschiedliche Werte annehmen, d.h.:

$$\begin{aligned} \text{(a)} \quad \left(-\frac{1}{T_2}\right) |5/2\rangle \leftrightarrow |3/2\rangle &= \left(-\frac{1}{T_2}\right) |-5/2\rangle \leftrightarrow |-3/2\rangle \\ \text{c)} \quad \left(\frac{1}{T_2}\right) |-1/2\rangle \leftrightarrow |1/2\rangle & \\ \text{b)} \quad \left(-\frac{1}{T_2}\right) |3/2\rangle \leftrightarrow |1/2\rangle &= \left(-\frac{1}{T_2}\right) |-3/2\rangle \leftrightarrow |-1/2\rangle \end{aligned}$$

In der Abb. 3.3 sind die Eigenwerte der Relaxationsmatrix - sie sind nach Gleichung (12) zu den Relaxationsraten proportional - in Abhängigkeit von τ_c aufgetragen.

Abb. 3.4 gibt das Verhalten der Intensitäten der fünf Feinstrukturübergänge in Abhängigkeit von τ_c wieder.

Man erkennt, daß über den gesamten Bereich von τ_c der $|_{\pm}1/2\rangle \leftrightarrow |_{\mp}1/2\rangle$ Übergang die kleinste Linienbreite aufweist.

Der Intensitätsanteil des selben Übergangs hingegen fällt im Q-BAND bei $\tau_c > 3 \cdot 10^{-12}$ s und im X-BAND bei $\tau_c > 10 \cdot 10^{-12}$ s rasch auf 25 % ab. Das Maximum einer abgeleiteten Lorentzlinie, wie man es im konventionellen ESR-Spektrometer beobachtet, ist aber umgekehrt proportional zum Quadrat der Relaxationsrate. So wird es verständlich, daß die beiden Übergänge $|+3/2\rangle \leftrightarrow |+1/2\rangle$ und $|+5/2\rangle \leftrightarrow |+3/2\rangle$ trotz ihres für $\tau_c > 10$ ps erhöhten Intensitätsanteils wegen ihrer großen Relaxationsraten nur geringfügig zur Linienform der 1. Linie beitragen können.

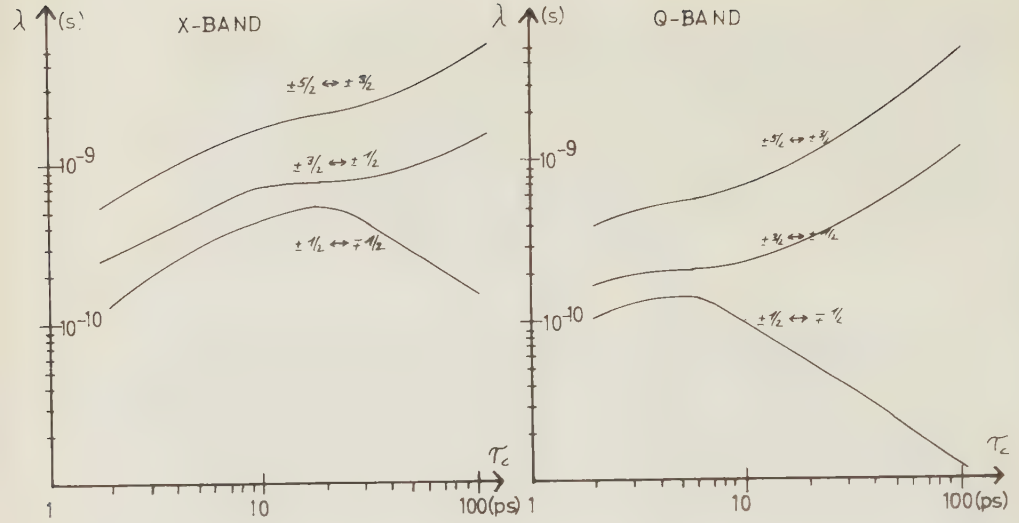


Abb. 3.3: Eigenwerte der Relaxationsmatrix

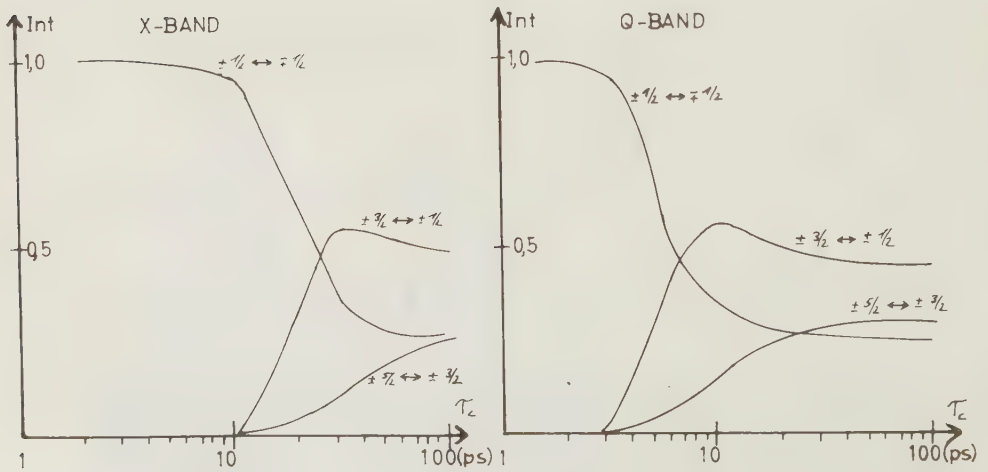


Abb. 3.4: Intensitäten der ESR-Übergänge

3.4.3 Simulierte Spektren und Linienbreiten

Wie in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt, ist das simulierte Mn^{++} -Spektrum durch die beiden Parameter τ_c und Δ sowie die Frequenzangabe hinreichend bestimmt.

Um die Parameter τ_c und Δ aus den experimentellen Spektren zu extrahieren, kann man zwei Wege beschreiten:

- a) Man vergleicht visuell (26,28) die experimentellen X- und Q-BAND-Spektren mit den Computerplots.

Zu diesem Zweck wurden auf den folgenden Seiten (Abb. 3.5) die Computerplots der Mn^{++} Spektren für $\tau_c = 4,8,16,32ps$ und $\Delta = 135,185,235,285,335,385$ Gs dargestellt. X- und Q-BAND-Spektren sind einander gegenübergestellt. Ein weiterer Vorteil dieser Darstellung wird in Abschnitt 4.2 sichtbar werden.

- b) Man ermittelt mit einem anderen Programm die Linienbreiten ΔH^{PP} - Abstand Maximum zu Minimum der derivierten Lorentzlinie, gemessen in Feldrichtung - der 1. Hyperfeinstruktur-Linie und stellt ΔH^{PP} als Funktion von τ_c mit Δ als Parameter dar (Abb. 3.6).

Aus der experimentell gemessenen Linienbreite im X- und Q-BAND kann dann mittels Abb. 3.6 direkt auf τ_c und Δ geschlossen werden. Die Parameter der mitochondrialen Matrixfraktion werden in Abschnitt 5.3 auf diese Weise bestimmt.

Es sollen nun noch kurz einige Phänomene anhand der Abb. 3.5 diskutiert werden:

Für $\tau_c = 16ps$ und $\Delta \geq 285$ Gs können die sechs Linien des "Mn-Sextetts" im X-BAND nicht mehr aufgelöst werden, während sie im Q-BAND über den ganzen Bereich von τ_c erhalten bleiben. Ein Repräsentant für diese Art von unstrukturierten Spektren ist der EDTA-Mn-Komplex in wässriger Lösung (28).

Die Spektren des EDTA-Mn-Komplexes gewinnen beim Übergang vom X-BAND in das Q-BAND wieder eine "Sextett-Struktur". Die relevanten Matrix- und Exchangesignale der mitochondrialen Mn^{++} -Spektren werden damit im Q-BAND durch ein weiteres "Sextett" überlagert. Dadurch wird die Zerlegung der Spektren erheblich erschwert (vgl. Abschnitt 4.2).

Geht man mit den in der Literatur für wäßrige $MnCl_2$ -Lösungen geringer Konzentration (kleiner 2mM) angegebenen Werten von $\tau_c = 3,3ps$ und $\Delta = 135$ Gs (26) in die Abb. 3.5 ein, so erhält man für die Linienbreite der simulierten Spektren $\Delta H^{PP} = 8$ Gs (im X-BAND).

Dieser Wert steht in Widerspruch zu den Daten von Mc. Garvey (21) und Garret (30) sowie zu den in dieser Arbeit beobachteten Linienbreiten:

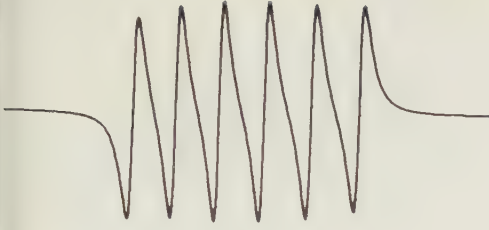
	X-BAND	Q-BAND	Anm.: a) gemessen im O_2 freien Zustand
ΔH^{PP}	23,6 Gs	13,9 Gs	b) $\Delta H^{PP}(4.Linie) = \Delta H^{PP}(1.Linie)$

Ursache dieser Abweichung ist die inhomogene Linienverbreiterung als Folge der Feinstrukturaufspaltung innerhalb einer Linie des "Sextetts". Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, ist die Redfieldsche Relaxationstheorie zur Beschreibung der Linienbreite des $Mn(H_2O)_6^{++}$ -Komplexes nicht geeignet. Die beobachtbaren Linienformen lassen sich in diesem Fall, wie Luckhurst (22) gezeigt hat, nur mit Hilfe eines Ansatzes von Binsch (29) beschreiben.

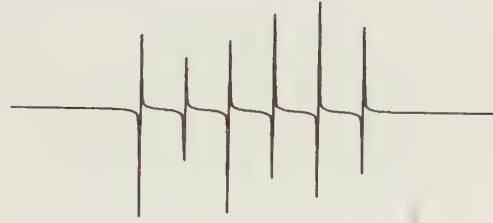
Die unter a) und b) beschriebenen Verfahren sind also nur dann sinnvoll, wenn die inhomogene Verbreiterung gegenüber der Linienbreite zu vernachlässigen ist (vgl. Fall (a) in Abschnitt 3.2).

Wie die Ergebnisse von Goldammer und Reed (26,28) zeigen, darf die Vernachlässigung für $\Delta > 195$ Gs und $\tau_c > 8$ ps vorgenommen werden. Die hier auszuwertenden Messungen liegen in diesem Bereich.

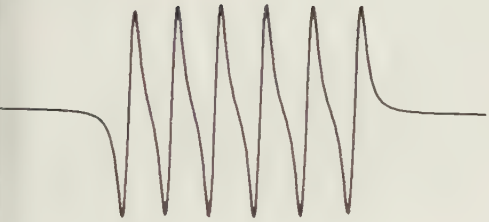
TC = 31.6 PS



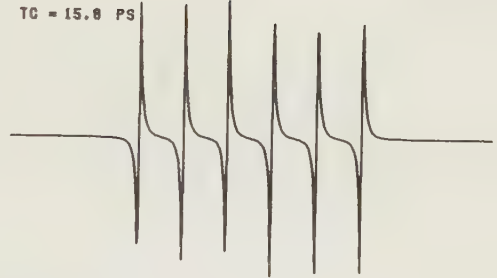
TC = 31.6 PS



TC = 15.6 PS



TC = 15.6 PS



$\Delta = 135 \text{ Gs}$

TC = 7.9 PS



TC = 7.9 PS



222 Gs

TC = 4.0 PS



TC = 4.0 PS

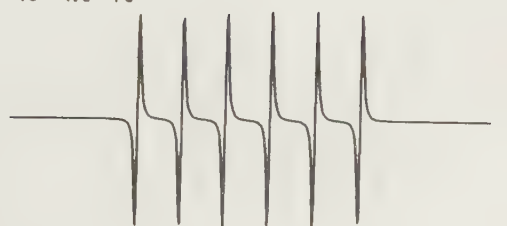
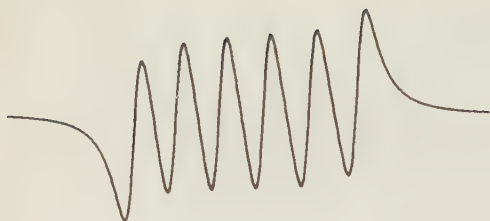
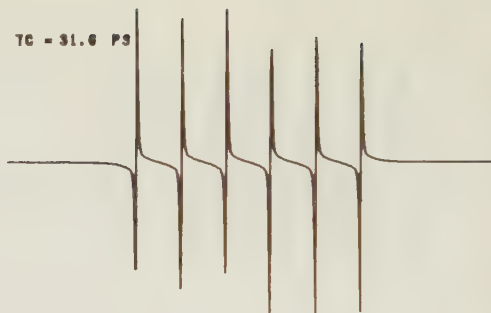


Abb. 3.5: Simulierte Mn-Spektren. Links: X-BAND, rechts: Q-BAND

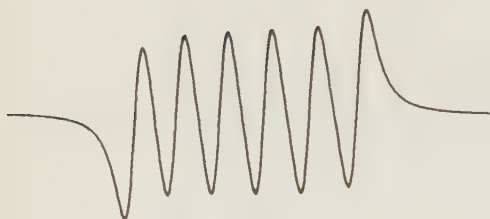
TC = 31.0 PS



TC = 31.0 PS



TC = 15.0 PS

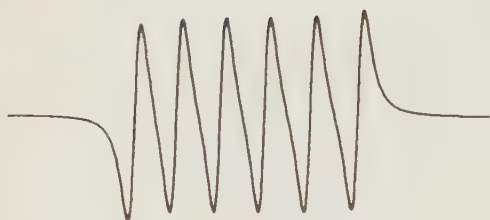


TC = 15.0 PS



$\Delta = 185$ Cs

TC = 7.9 PS



TC = 7.9 PS



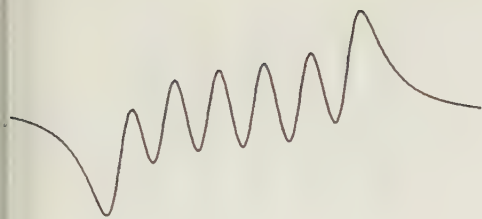
TC = 4.0 PS



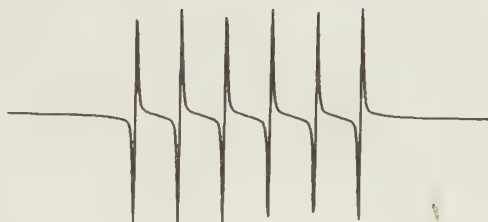
TC = 4.0 PS



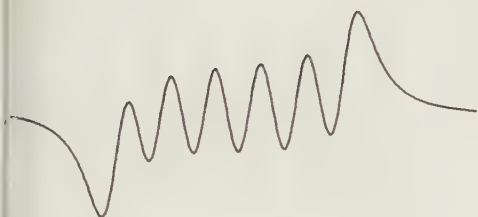
C = 31.6 PS



TC = 31.6 PS



C = 15.8 PS

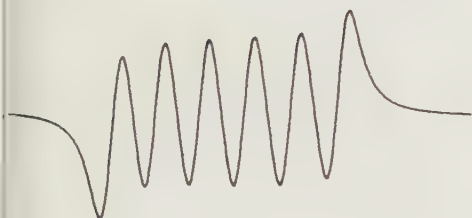


TC = 15.8 PS

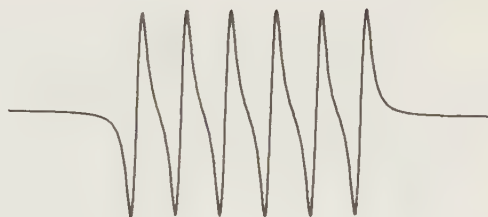


$\Delta = 235$ Gs

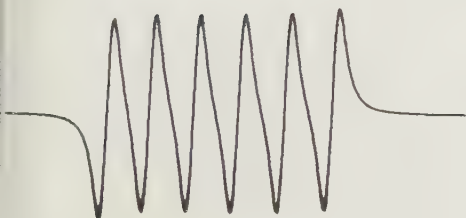
C = 7.9 PS



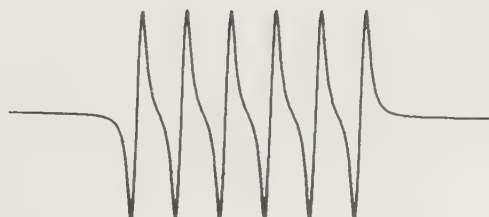
TC = 7.9 PS



C = 4.0 PS



TC = 4.0 PS



TC = 31.0 PS



TC = 31.0 PS



TC = 15.0 PS

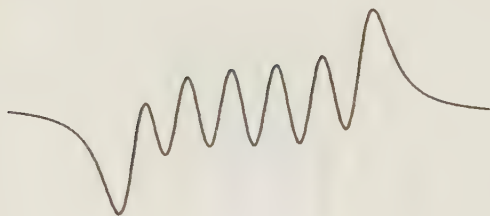


TC = 15.0 PS

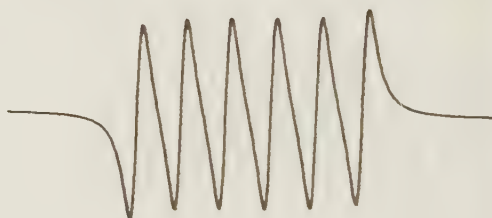


$\Delta = 285$ Gs

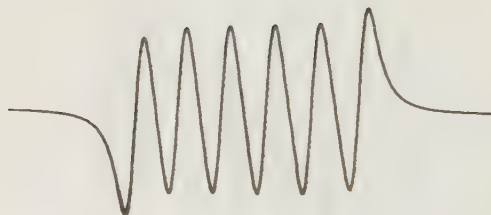
TC = 7.9 PS



TC = 7.9 PS



TC = 4.0 PS



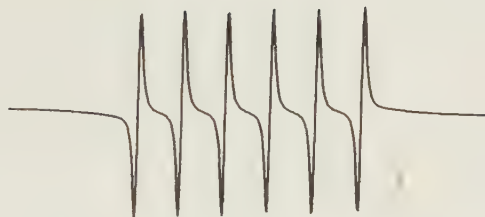
TC = 4.0 PS



TC = 31.6 PS



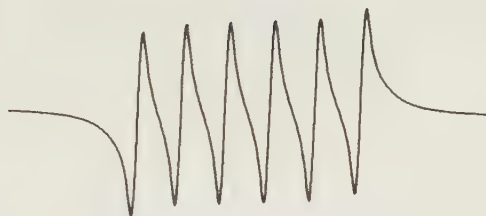
TC = 31.6 PS



TC = 15.8 PS



TC = 15.8 PS

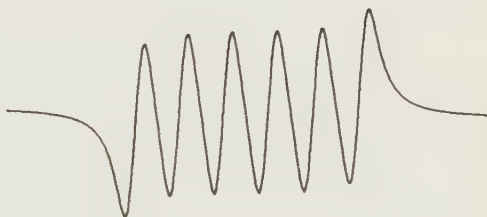


$\Delta = 335 \text{ Gs}$

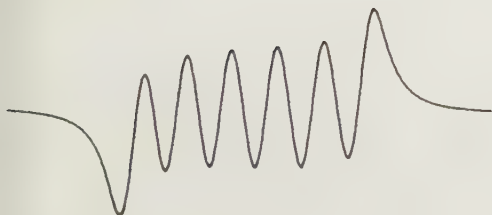
TC = 7.9 PS



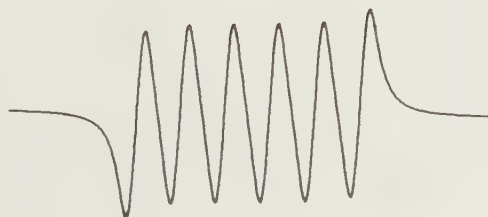
TC = 7.9 PS



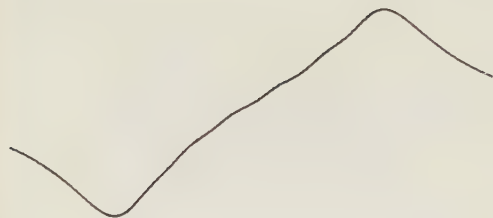
TC = 4.0 PS



TC = 4.0 PS



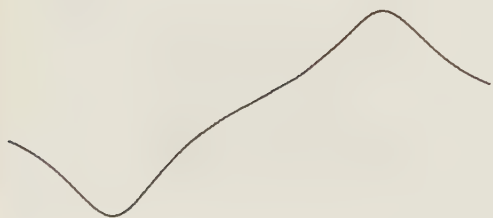
TC = 31.6 PS



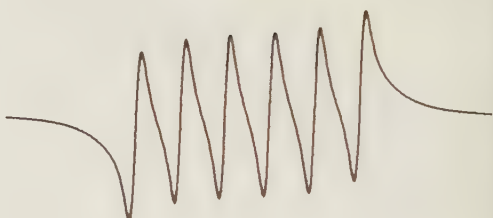
TC = 31.6 PS



TC = 15.8 PS



TC = 15.8 PS

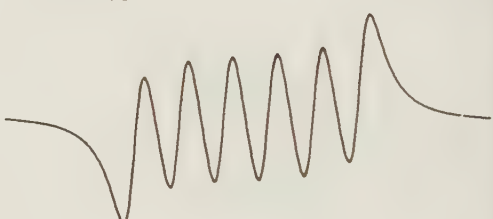


$\Delta = 385 \text{ Gs}$

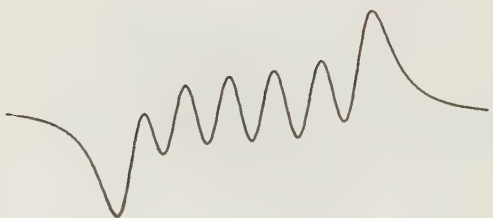
TC = 7.9 PS



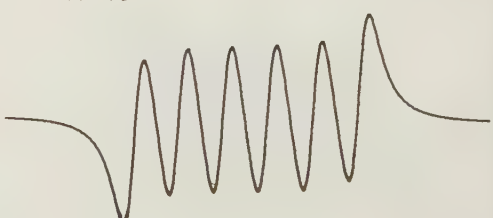
TC = 7.9 PS



TC = 4.0 PS



TC = 4.0 PS



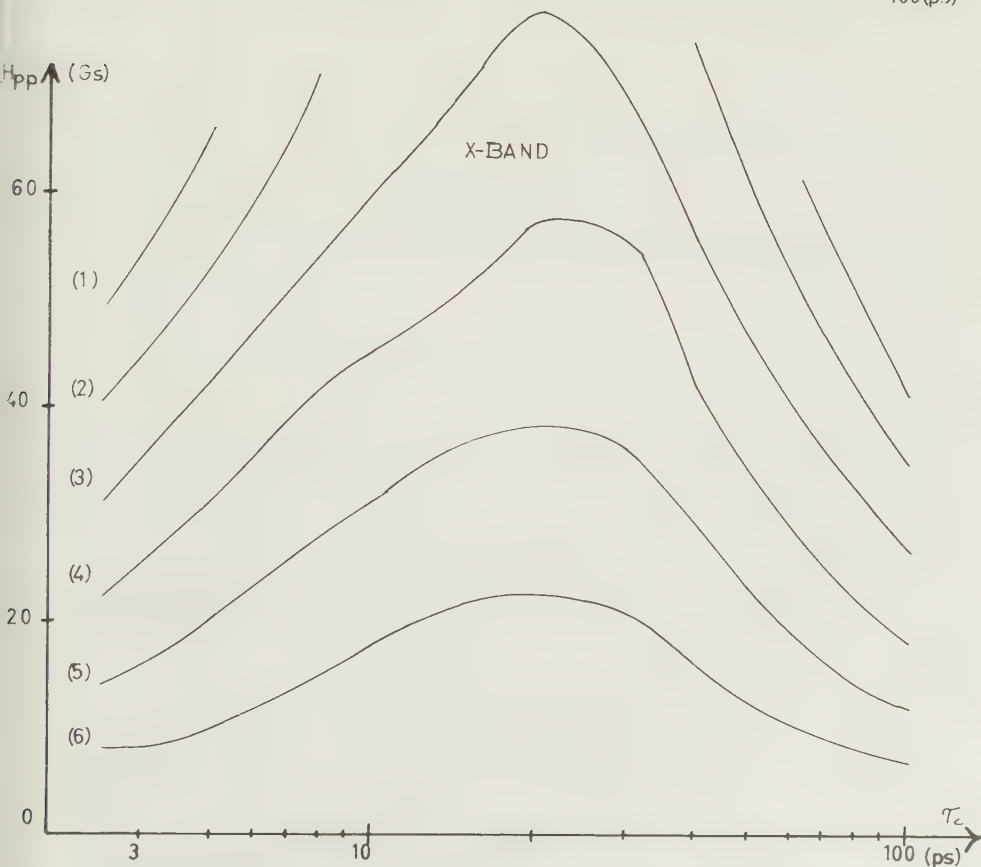
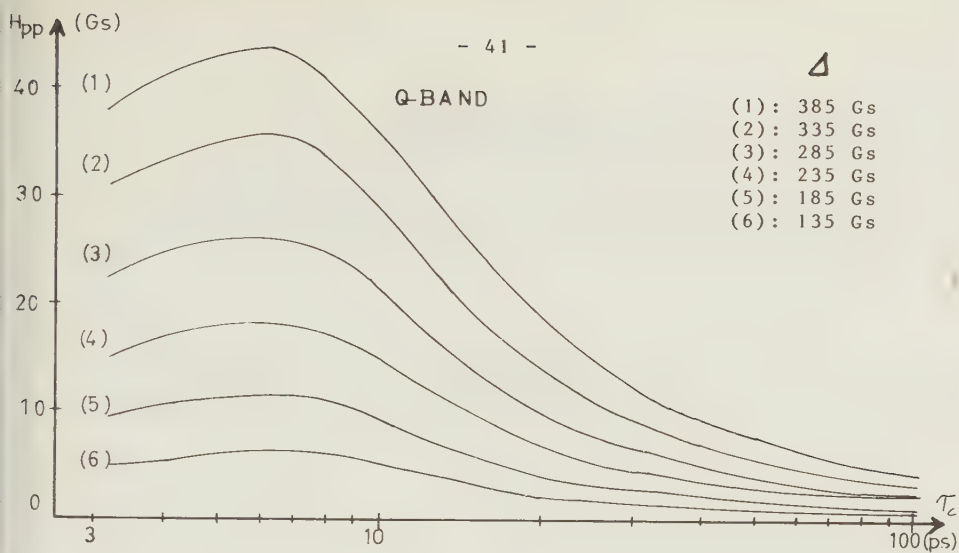


Abb. 3.6: Linienbreiten der 1. Linie in Abhängigkeit von τ_c, Δ

3.5 Gültigkeit des Redfieldschen Formalismus

Eine wesentliche Voraussetzung für die Gültigkeit der Redfield'schen Relaxationstheorie (23) ist die Bedingung (vgl. Abschnitt 3.2):

$$\frac{T_2}{T_c} \gg 1$$

Da T_2 selbst eine Funktion von T_c und Δ ist, läßt sich T_2/T_c als Funktion von T_c mit Δ als Parameter darstellen (Abb. 3.7).

$$f(T_c, \Delta) = \frac{T_2}{T_c}$$

Für den Übergang $|^{\pm}5/2\rangle \leftrightarrow |^{\pm}3/2\rangle$ nimmt $f(T_c, \Delta)$ im X-BAND, wie auch im Q-BAND den kleinsten Wert an. Dieser Übergang ist somit für die weiteren Betrachtungen limitierend.

Fordert man $f(T_c, \Delta) > 10$ und $\Delta = 200$ Gs, so ist dies nur für $T_c < 37$ ps erfüllbar.

Fordert man $f(T_c, \Delta) > 10$ und $\Delta = 335$ Gs, so ist dies nur für $T_c < 16$ ps erfüllbar. Im Q-BAND ist die letzte Forderung bis $T_c = 25$ ps erfüllt, eine Spektren-Simulation mithin bis zu diesem Wert sinnvoll!

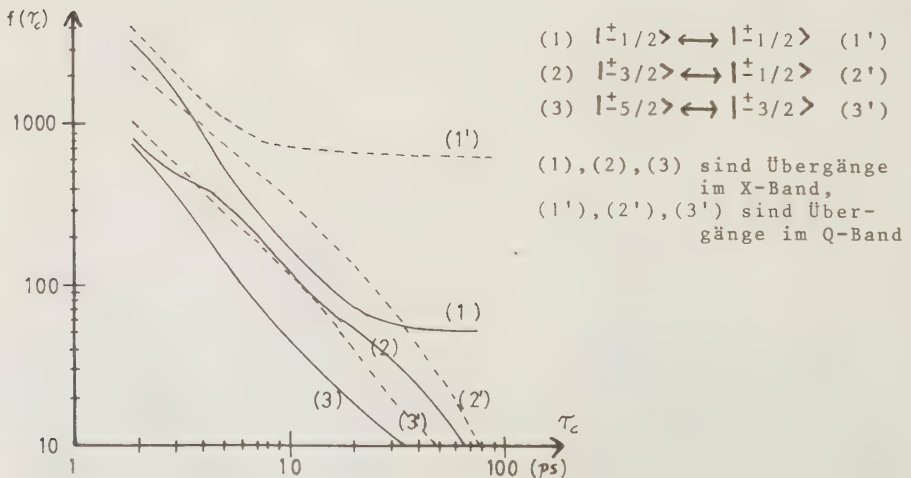


Abb. 3.7: T_2/T_c in Abhängigkeit von T_c $\Delta = 200$ Gs

4. ESR-Untersuchungen von Mn^{++} in Mitochondrien

Den Ausgangspunkt für den folgenden Abschnitt stellen die Arbeiten von Gunter und Puskin dar (4,31).

Diese Autoren inkubierten Rattenlebermitochondrien (RLM) einer Konzentration von 10 mg/ml mit 200 nmol/mg $MnCl_2$, soppten nach 10 Min. die Mn-Akkumulation mit einem kleinen Überschuß an EDTA und beobachteten im X-BAND das in Abb. 4.0 dargestellte ESR-Spektrum.



Abb. 4.0: ESR-Spektrum von Mn in RLM

Eine Computerzerlegung ergab die folgenden 3 Anteile:



Exchange-Fraktion



EDTA-Mn-Fraktion



Matrix-Fraktion

Das von Gunter zur Interpretation dieser Spektren aufgestellte Modell soll uns bis auf weiteres als Arbeitsgrundlage dienen:

1) Die Zugabe von EDTA komplexiert alles EDTA zugängliche Mn^{++} . Erst die große Linienbreite des unstrukturierten ESR-Signals des Mn-EDTA-Komplexes (vgl. Abschnitt 3.4.3) ermöglicht die Beobachtung des mitochondrial gebundenen Mn^{++} !

2) Die Matrix-Fraktion repräsentiert dasjenige Mn^{++} , welches sich in niedrig viskosen Bereichen der Mitochondrien aufhält. Weitergehende Experimente von Puskin (32) ordnen diese Fraktion dem Matrixraum der Mitochondrien zu.

3) Die erste Fraktion kann aufgrund ihrer Linienbreite $\Delta H < 280$ Gs, welche damit weit unterhalb der Ausdehnung des Mn "Sextetts" $\Delta H = 465$ Gs liegt, nur durch eine Austausch-Wechselwirkung erklärt werden.

Voraussetzung für eine solche Austausch-Wechselwirkung ist eine dicht gepackte Anordnung der Mn^{++} -Ionen, die einen raschen Austausch (ω_e) der 3d Elektronen durch Überlappung der Orbitale ermöglicht.

Als Ort solcher Mn^{++} -Cluster wird die innere Mitochondrienmembran postuliert.

4) In Gegenwart von anorganischem PO_4 wird die Mn^{++} -Akkumulation um den Faktor 2 erhöht (Abschnitt 2.5). Im ESR-Spektrum wird aber die Matrixfraktion anteilig zurückgedrängt; die Linienbreite der Exchangefraktion steigt geringfügig an.

Diese Art von Spektrum wird einem in den Mitochondrien abgelagerten Präzipitat von $Mn-PO_4$ zugeordnet. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von $Mn-PO_4$ beladenen Mitochondrien können diese Zuordnung nahelegen (33).

Ein Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung und Lokalisation der Exchange-Fraktion in der mitochondrialen Membran. Von entscheidender Bedeutung ist dabei das Verhalten der Mn-Spektren bei Zugabe von PO_4 . Aus dem Vergleich der Spektren - in Gegenwart und Abwesenheit von PO_4 - im X-BAND, sowie dem Verhalten der Mn-Spektren beim Übergang X-BAND ins Q-BAND, können Schlüsse gezogen werden, die über die Arbeit von Gunter hinausgehen. Will man die oben beschriebenen Messungen auf das Q-BAND ausdehnen, so sieht man sich primär zwei Problemen gegenüber:

a) Messungen in wäßriger Phase limitieren die einsetzbaren Volumina im Q-BAND auf $V^Q = 2 \mu l$ gegenüber $V^X = 150 \mu l$ im X-BAND. Dies führt, trotz der Empfindlichkeitserhöhung durch den Übergang zur 4fachen Feldstärke, zu einem entscheidenden Empfindlichkeitsverlust (siehe Tabelle 5.1). Die Konzentration der eingesetzten Mitochondrien-Suspension mußte daher gegenüber den Konzentrationen bei Puskin um einen Faktor 5-10 erhöht werden. In Abschnitt 2.6 wurde gezeigt, daß sich das Bindungsverhalten von Mn^{++} in diesen Konzentrationsbereichen nicht verändert.

b) Die EDTA-Mn-Komplexierung, welche im X-BAND die Beobachtung des innermitochondrial gebundenen Mn^{++} ermöglichte, kompliziert im Q-BAND die Spektren: Wie in Abschnitt 3.4.3 gezeigt, gewinnt der EDTA-Mn-Komplex im Q-BAND wieder seine Sextett-Struktur. Wie man dem folgenden Flußdiagramm entnehmen kann, führt die Überlagerung des EDTA-Mn- und des Matrix-Signals zu einem "10-Linien-Spektrum".

Beiden Problemen a), b) kann begegnet werden, indem man die Mitochondrien mit Mn^{++} anreichert (siehe folgendes Flußdiagramm) und anschließend das nicht gebundene Mn^{++} 1-2 mal abzentrifugiert. Auf diese Weise wird die Konzentration des freien, durch EDTA komplexierbaren Mn^{++} drastisch erniedrigt.

Da EDTA auch das an der Membranoberfläche gebundene Mn^{++} komplexiert (siehe Abb. 2.1) kann das EDTA-Mn-Signal nie unter 10 % des Gesamtsignals gedrückt werden.

Eine Kontrolle der ESR-Messungen hinsichtlich der gesamten Mn^{++} -Bindung wurde durch gleichzeitige radioaktive Markierung des Mn^{++} mit Mn^{54} ermöglicht.

4.1 Übersicht über Versuchsablauf und Auswertung

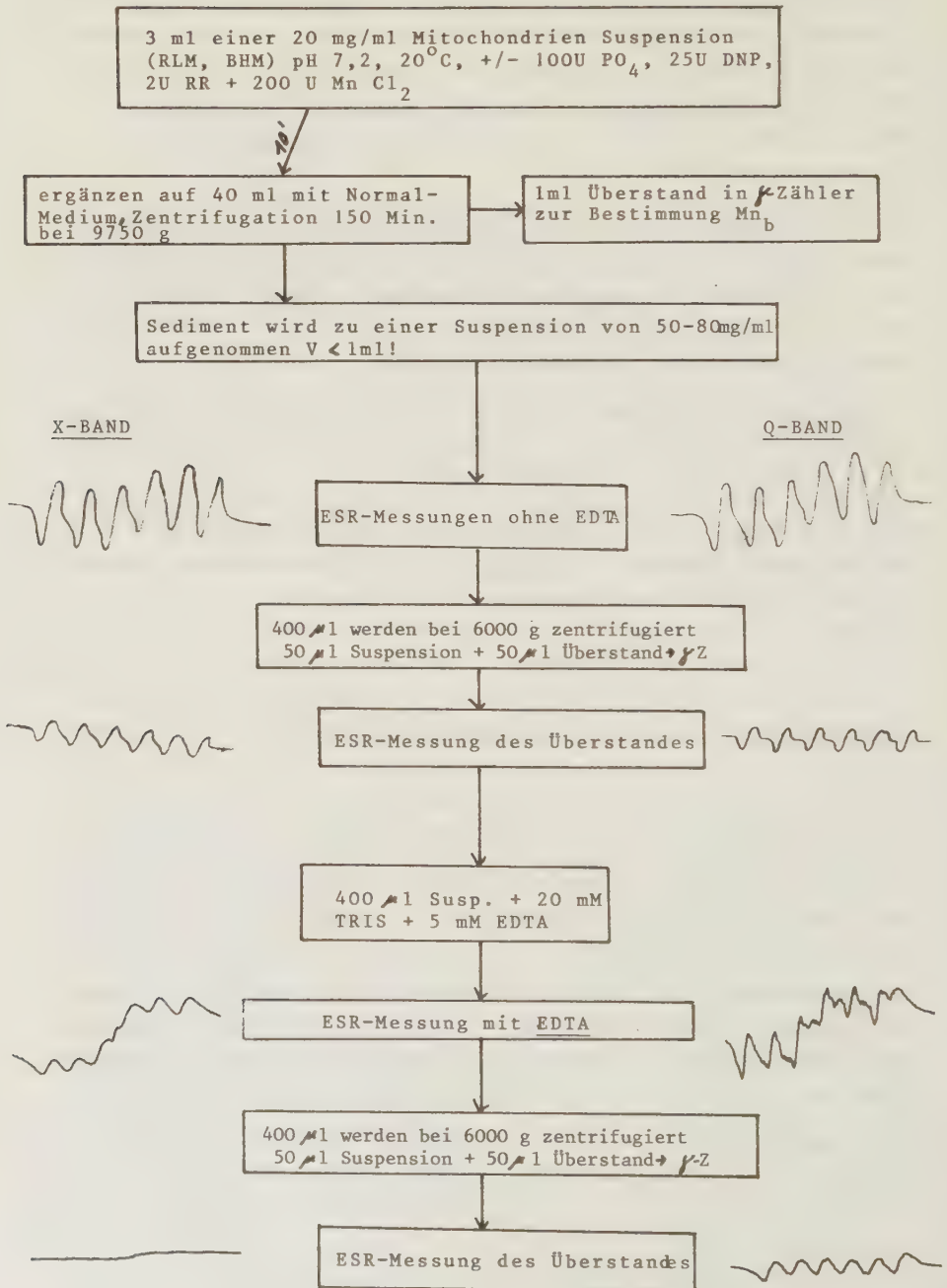
Für die ESR-Messungen stand ein 100KHZ Feldmodulations-Spektrometer der Firma JEOL ltd., Tokyo JES-PE-3X, Q zur Verfügung.

Im X-BAND (9.52 GHz) wurde mit einer Flachzelle ($V=150\mu l$), im Q-BAND (35,8 GHz) mit einer Quarzkapillare von 0.2 mm Durchmesser gearbeitet.

Die Messungen wurden im klimatisierten Labor durchgeführt; nur im Q-BAND mußte die Proben temperatur infolge der großen Wärmeabgabe der Modulationsspulen mit Preßluftstrom stabilisiert werden.

Im folgenden Schema soll der prinzipielle Ablauf einer ESR-Messung an mitochondrialem Mn^{++} dargestellt werden.

Abb. 4.1: Versuchsablauf einer ESR-Messung an Mitochondrien



Die Auswertung eines solchen Experiments verläuft in 2 Stufen:

a) Zerlegung der beobachteten X- und Q-BAND Spektren in ihre Matrix- und Exchange-Anteile

Bezeichnungen	X-BAND		Q-BAND	
	Amplitude	Linienbreite	Amplitude	Linienbreite
Matrix:	A_m^X	H_m^X	A_m^Q	H_m^Q
Exchange:	A_e^X	H_e^X	A_e^Q	H_e^Q

Linienbreite jeweils gemessen von Maximum zu Minimum in Feldrichtung.

b) Aus den cpm des γ -Zählers wird auf die Gesamtbindung des Mn^{++} geschlossen. Übersteigt die so ermittelte Gesamtbindung die aus den ESR-Daten berechenbare Bindung, so kann auf einen unaufgelösten Anteil der ESR-Spektren geschlossen werden (vgl. Abschnitt 4.3).

Die Diskussion hat dann auf das Verhalten der Parameter A_m, A_e, H_m, H_e im X-BAND und Q-BAND einzugehen!

4.2 Zerlegung der Mn^{++} -Spektren von Mitochondrien

Das folgende Flußdiagramm gibt schematisch die dem in Anhang II dargestellten Computerprogramm entnommenen Schritte zur Spektrenzerlegung wieder. Sie sollen kurz kommentiert werden.

Das Mn^{++} -Spektrum der Mitochondrien (EXP(I)) und das Spektrum des zugehörigen Überstandes (EDTA(I)) werden mit einer Schrittweite von 2.78 Gs in 260 Datenpunkte aufgelöst.

In das Spektrum wird "frei Hand" eine Lorentzlinie eingezeichnet. Aus ihr läßt sich in erster Näherung die Linienbreite DH_1 - gemessen von Maximum zu Minimum - sowie die Amplitude AMP_1 entnehmen. Außerdem erhält man die Feldkoordinate H_0 des Nulldurchgangs der abgeleiteten Lorentzlinie.

Aus den vorliegenden Spektren lassen sich ebenfalls die Feldkoordinaten der Maxima und Minima des Matrixsignals bestimmen: AA(1..6), BB(1..6). Ausgehend von diesen Koordinaten, sucht das Unterprogramm "Maximum" später die exakten Feldkoordinaten FA(1..6), FB(1..6).

Die starke Abhängigkeit der Empfindlichkeit vom Probenort im Q-BAND verhindert eine verlässliche Bestimmung von Differenzspektren. Die Einführung eines Faktors NE trägt dem Rechnung. Man erhält:

$$\text{DIFF}(I) = \text{EXP}(I) - \text{NE EDTA}(I);$$

Ausgehend von den Parametern AMP_1 , DH_1 , HO wird nun für $\text{AMP} \in (\text{AMP}_1 - \text{FINA}, \text{AMP}_1 + \text{FINA})$ und $\text{DH} \in (\text{DH}_1 - \text{FINH}, \text{DH}_1 + \text{FINH})$ eine differenzierte Lorentzlinie berechnet:

$$\text{LOR}(H) = \text{NEX} \frac{2}{\pi} \frac{T_2^3 \cdot (H - \text{HO}) \cdot a}{\{1 + [T_2 (H - \text{HO}) a]^2\}^2}$$

$$a = 1,76 \cdot 10^7 \frac{\text{rad}}{\text{sec Gs}} \quad T_2 = \frac{2}{\sqrt{3} \cdot a \cdot \text{DH}}$$

$$\text{NEX} = 1,2 \cdot 10^{15} \cdot \text{AMP} \cdot \text{DH}^2$$

Der Faktor NEX gewährleistet, daß bei Variation von DH die Amplitude der Lorentzlinie ihren vorgegebenen Wert von AMP beibehält.

Da die Berechnung der Differenzspektren $\text{MATRIX}(I) = \text{DIFF}(I) - \text{LOR}(I)$ bei der Variation aller Parameter NE, HO, AMP, DH zu Rechenzeiten über 10 Min. führen würde, werden die MATRIX-Spektren zunächst nur für AMP_1 , DH_1 , HO berechnet und geplottet, Diesen stark verzerrten Matrixspektren werden die Koordinaten AA(I) der Maxima (1. Näherung) entnommen. An diesen Orten werden fortan die Werte für DIFF(I), LOR(I) und MATRIX(I) bestimmt.

Die in Abb. 3.5 dargestellten simulierten Mn^{++} -Spektren geben nun Kriterien, denen die Matrix-Spektren unterworfen werden.



Abb. 4.2: Kriterien für ein sinnvolles Matrix-Spektrum

Man entnimmt Abb. 4.2:

$$D(I) = \text{MATRIX}(\text{AA}(I+1)) - \text{MATRIX}(\text{AA}(I)) \quad I = 1..5$$

a) Q-BAND

$$\begin{aligned} \text{QUAD6} &= \sum_{I=1}^5 (\text{SUM6} - D(I))^2 < E4 & E4 \rightarrow 0 \\ \text{SUMA6} &= \sum_{I=1}^5 |D(I)| < E5 & E5 \rightarrow 0 \\ &\text{mit SUM6} = \frac{1}{5} \sum_{I=1}^5 D(I) \end{aligned}$$

b) X-BAND

$$\begin{aligned} \text{QUAD4} &= \sum_{I=2}^4 (\text{SUM4} - D(I))^2 < E1 & E1 \rightarrow 0 \\ \text{SUMA4} &= \sum_{I=2}^4 |D(I)| < E2 & E2 \rightarrow 0 \\ \text{TEND} &= D(5) - D(1) > E3 \end{aligned}$$

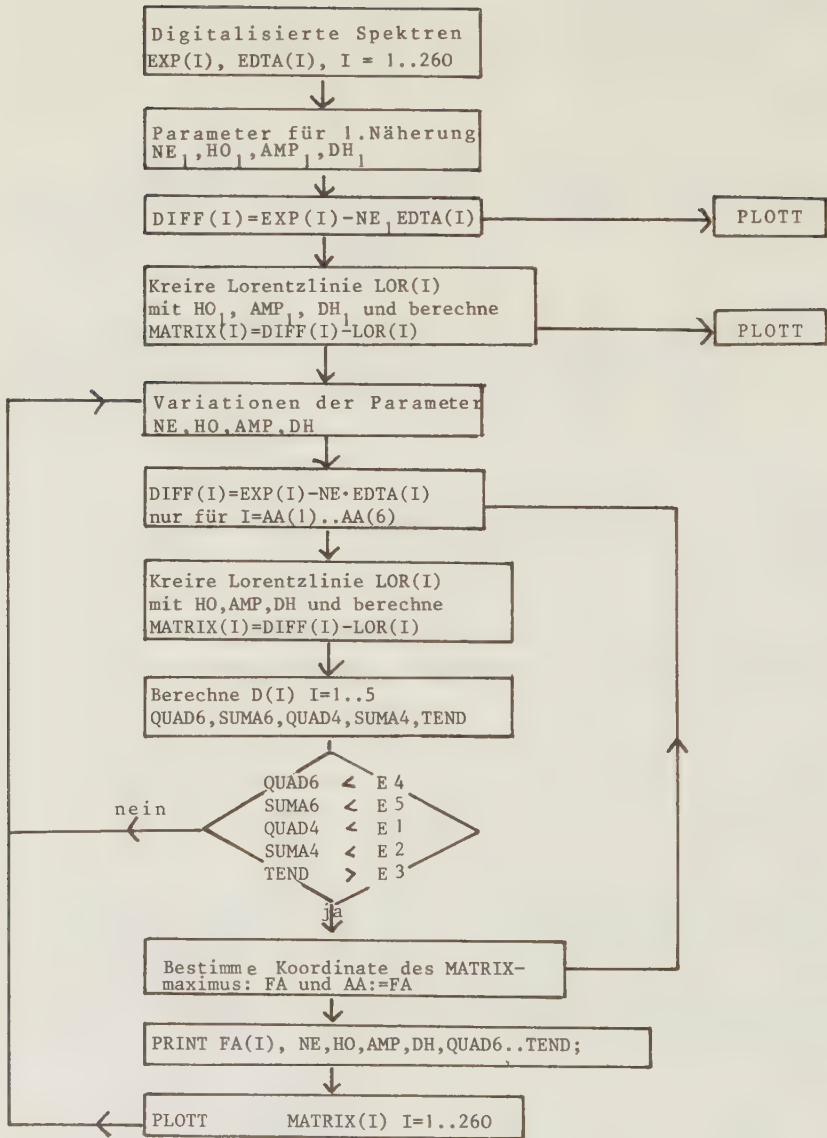
Sind die 3 Bedingungen im X-BAND bzw. die 2 Bedingungen im Q-BAND für ein 4-Tupel (NE,HO,AMP,DH) erfüllt, so erfolgt die vollständige Berechnung und das Plotten von MATRIX(I).

Zusätzlich wird durch das Unterprogramm "Maximum" (bzw. "MINIMUM") die exakte Lage der Matrixmaxima FA(I) bestimmt und zusammen mit NE,HO,AMP,DH ausgedruckt.

In einem neuen Programmlauf werden den AA(I) die berechneten FA(I) zugewiesen. Die Lösung wird eindeutig, wenn schließlich für alle Parameter HO,NE, AMP,DH immer AA(I) = FA(I) wird!

Von allen 4-Tupeln (NE,HO,AMP,DH), welche die oben genannten Kriterien erfüllen, bestimmt dasjenige, welches QUAD6 und SUMA6 bzw. QUAD4, SUMA4 und TEND zum absoluten Minimum macht, die gesuchten Exchange- und Matrix-Anteile des Mn^{++} -Spektrums.

Im Anhang wird gezeigt, daß dieses Verfahren zu eindeutigen Lösungen führt.



Flußdiagramm zum Ablauf der Spektrenzerlegung.

4.3 Bindung von $^{54}\text{Mn}^{++}$

Die zu den ESR-Messungen eingesetzten hohen mitochondrialen Konzentrationen erfordern hinsichtlich der Auswertung der radioaktiven ^{54}Mn -Bindung eine andere Auswertung als die in Abschnitt 2.1 beschriebene.

50 μl von der mit Mn^{++} beladenen Mitochondriensuspension und 50 μl des Überstandes werden in 1ml Lubrol (2 %) gelöst und in den γ -Zähler gegeben: cpm^t , cpm^u

Die Gesamtbindung des Mn^{++} (in Membran und Matrix) kann dann aufgrund der folgenden Formel berechnet werden:

$$\text{Mn}_b = \frac{1000}{c_m \cdot s_a} \left(\frac{\text{cpm}^t}{v^t} - \left(1 - \frac{v_m}{1000} c_m\right) \frac{\text{cpm}^u}{v^u} \right) \text{ nmol/mg}, \quad s_a = \frac{\text{cpm}^{\text{total}}}{\text{Mn}_t (\text{nmol})}$$

Als mitochondriales Matrixvolumen V_m wurde der literaturübliche Wert (32) von $V_m \leftarrow 5 \mu\text{l/mg}$ angenommen.

Die berechnete Bindung zeigt nur bei niedrigen Bindungswerten eine starke Abhängigkeit von der Wahl dieses Parameters.

4.4 Quantifizierung der Mn^{++} -Spektren

Untersucht man die Mn^{++} -Lösungen 5mM MnCl_2 , 4M MnCl_2 , 5mM MnCl_2 + 8mM EDTA und bezieht das Produkt S aus ΔH^2 und Amplitude A auf gleiche Konzentrationen (1mM) und Verstärkung (10/100), so beobachtet man unter der Voraussetzung des gleichen effektiven Volumens, daß S sowohl im X-BAND als auch im Q-BAND konstant ist. Die folgende Tabelle soll dies verdeutlichen.

Mit Hilfe dieser Daten kann aus der Messung einer 5 mM MnCl_2 Lösung jedem beobachtbaren Mn^{++} -Signal (Matrix, Exchange) eine Mn^{++} -Konzentration zugeordnet werden.

$$c = (H^{PP})^2 \cdot A \cdot E; \quad E := 5\text{mM} / S_{5\text{mM}}$$

Von großer Bedeutung für die weiteren Auswertungen ist das Verhalten der obigen Spektren hinsichtlich ΔH , A, S beim Übergang X-BAND $\rightarrow$ Q-BAND.

Wie schon in Abschnitt 3.4.3 ausgeführt, vermindert sich beim Übergang $X \rightarrow Q$ die Linienbreite, zusammen mit dem 4fachen Feldanstieg (=Signalerhöhung) resultiert daraus ein Empfindlichkeitsgewinn. Die bei wäßrigen Lösungen apparativ notwendige Volumenreduzierung der Probe ($150\mu\text{l} \rightarrow 10\mu\text{l}$) wirkt dem entgegen, so daß man in praxi einen Empfindlichkeitsverlust erhält. Die letzte Spalte der Tabelle 4.1 weist dieses Verhalten aus.

Da der Probenort im Q-BAND sehr entscheidend für die Empfindlichkeit ist, sind die S^X/S^Q -Werte mit großen Fehlern (40 %) behaftet. Sie sind stark von der Tagesform des Spektrometers und vor allem seines Operators abhängig und wurden folglich immer vorweg bestimmt.

Tabelle 4.1: Quantifizierung der Mn-Spektren in wäßriger Phase

A			$\Delta H^{\text{PP}}(\text{Gs})$	S	$S'(10^7)$	S^X/S^Q
X-BAND	5mM MnCl_2	$2,5 \cdot 10^4$	28	$1,2 \cdot 10^8$	2,4	76
	" +10mM EDTA	$1,1 \cdot 10^2$	970	$1,0 \cdot 10^8$	2,1	103
	5M MnCl_2	$2,2 \cdot 10^5$	580	$7,5 \cdot 10^{10}$	1,9	4
Q-BAND	5mM MnCl_2	$1,4 \cdot 10^3$	14	$1,6 \cdot 10^6$	0,031	-
	" +10mM EDTA	$8,8 \cdot 10^1$	44	$1,0 \cdot 10^6$	0,020	-
	4M MnCl_2	$9,4 \cdot 10^4$	444	$1,8 \cdot 10^{10}$	0,046	-

$$S = (6) \cdot A \cdot (H^{\text{PP}})^2 \quad S' = S / \text{conz. MnCl}_2 \text{ (mM)}$$

Der Faktor 6 berücksichtigt die 6 Linien des Mn-Sextetts

5. ESR Messungen an mitochondrialgebundenem Mn^{++} im X- und Q-BAND

5.1 Übersicht

Von den zahlreichen ESR-Messungen an RLM und BHM, welche das Verhalten des gebundenen Mn^{++} im X-BAND und Q-BAND zum Gegenstand hatten, soll nun eine repräsentative Messung ausgewertet und diskutiert werden.

Der Versuchsablauf folgt dem in Abschnitt 4.1 beschriebenen; verglichen werden die 3 Systeme:

N : RLM + Mn^{++}
 P : RLM + Mn^{++} + PO_4^{--}
 C : RLM + Mn^{++} + Ca^{++}

Die Computerzerlegung der experimentellen Spektren findet man in Abb. 5.1. Jeweils von oben nach unten befinden sich:

Experimentelles Spektrum, Überstandsspektrum, Differenzspektrum, Exchangesignal, Matrixsignal.

In Tabelle 5.1 sind alle wesentlichen, die Zerlegung charakterisierenden Daten zusammengestellt. Um die Daten der verschiedenen Systeme vergleichen zu können, sind sie alle auf die im Q-BAND verwendete Spektrometerverstärkung (10/100) normiert.

Der Übersichtlichkeit der Darstellung wegen sind die vertikalen Maßstäbe in Abb. 5.1 für die Systeme N,P,C unterschiedlich gewählt. Innerhalb eines Systems sind sie bis auf das Matrixsignal (seine Amplitude wäre sonst zu klein) gleich. Intensitätsvergleiche der Spektren verschiedener Systeme dürfen deshalb nur mit Hilfe der in der Tabelle 5.1 dargestellten Daten vorgenommen werden.

Amplitude A_m und Linienbreite H_m der Matrixfraktion werden stets der 1. Linie entnommen.

Die in den Matrixfraktionen sichtbar werdenden ESR-Signale bei $g=2$ können nach Hollocker (34) einem Radikal in den Mitochondrien zugeordnet werden; sie können auch ohne Mn^{++} -Beladung nachgewiesen werden und sind hier nicht Gegenstand weiterer Betrachtungen.



Experimentelles Spektrum

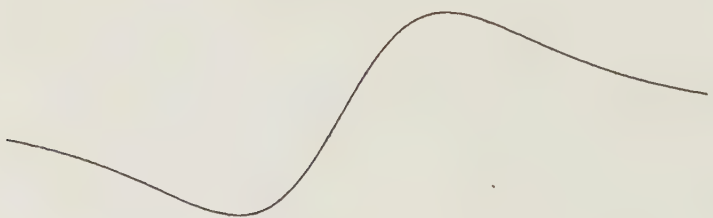


Überstandsspektrum

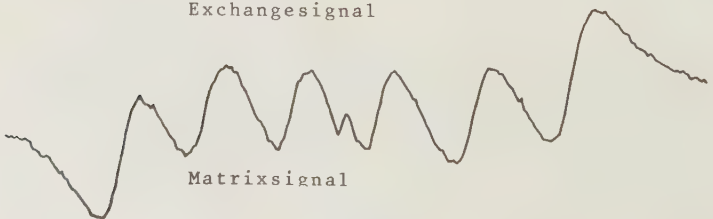


Differenzspektrum

200 Gs



Exchangesignal



Matrixsignal

Abb. 5.1.1: Zerlegung des Spektrums des N-Systems im X-BAND

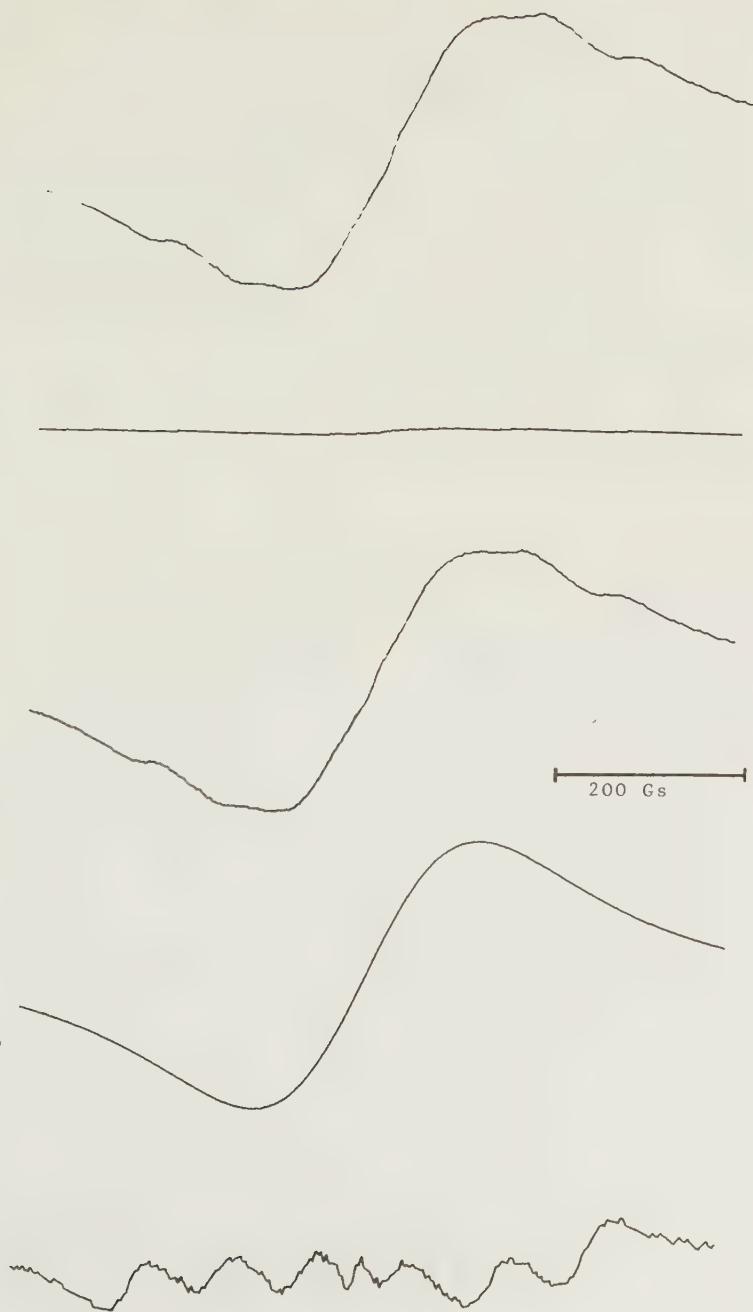


Abb. 5.1.2: Zerlegung des Spektrums des P-Systems im X-BAND

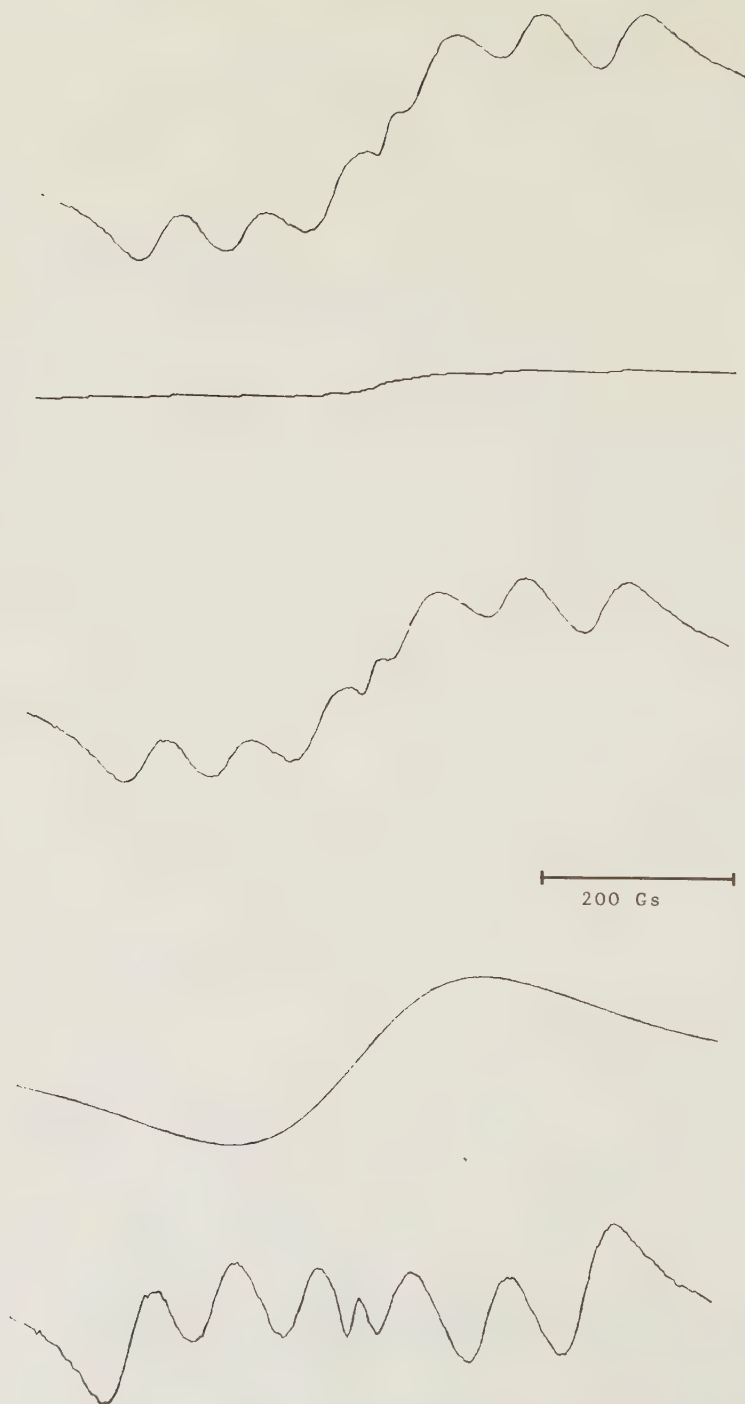


Abb. 5.1.3: Zerlegung des Spektrums des C-Systems im X-BAND

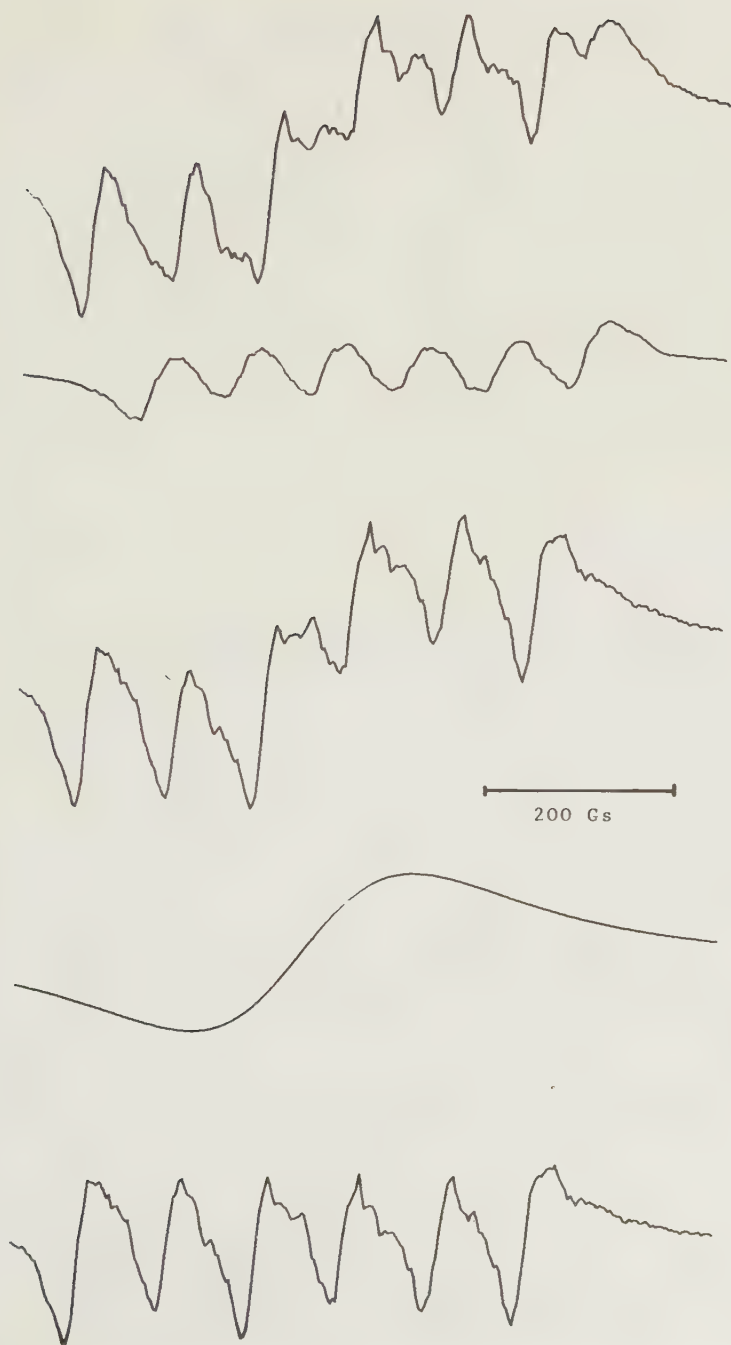


Abb. 5.1.4: Zerlegung des Spektrums des N-Systems im Q-BAND

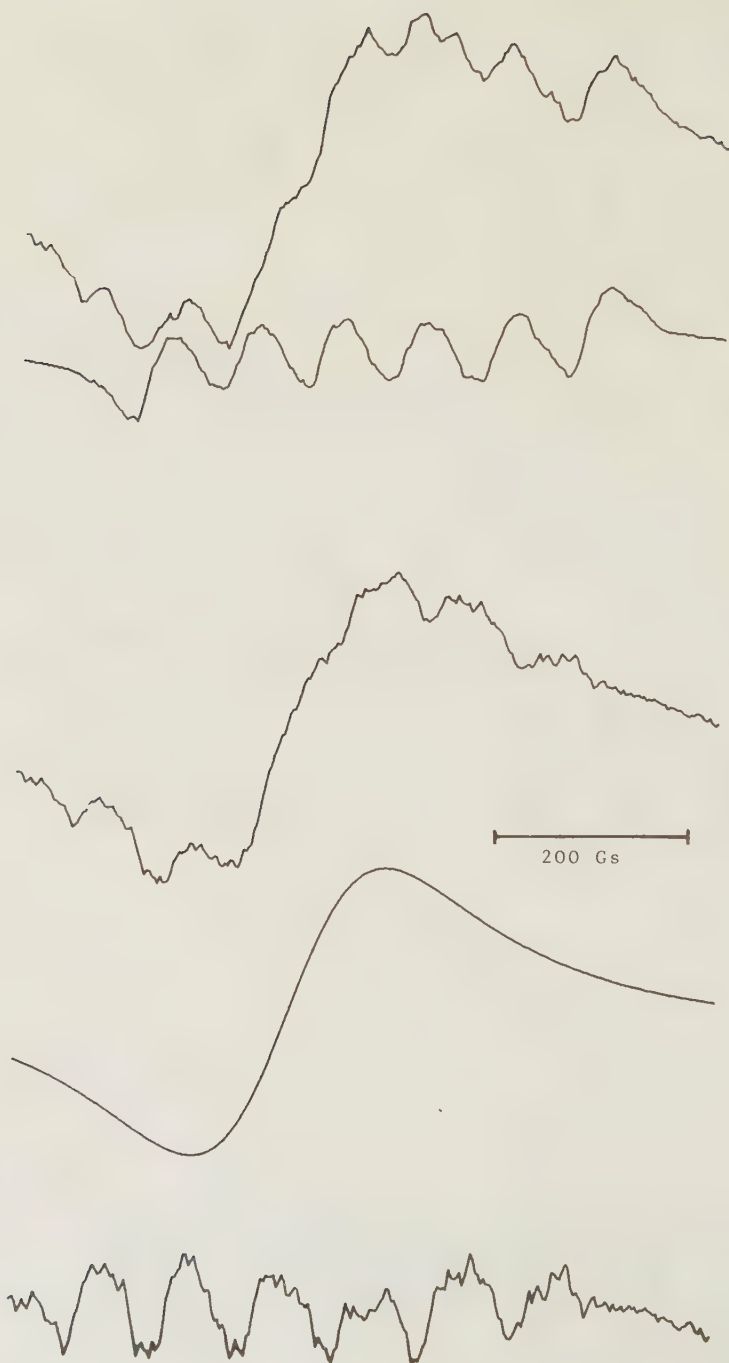


Abb.5.1.5: Zerlegung des Spektrums des P-Systems im Q-BAND

Tabelle 5.1: Linienbreiten und Amplituden der zerlegten Spektren:

EXCHANGE					MATRIX		
		H_e (Gs)	A_e	S_e	H_m (Gs)	A_m	S_m
X-BAND	N	218	480	$22,8 \cdot 10^6$	39	143	$1,31 \cdot 10^6$
	P	228	1470	$76,4 \cdot 10^6$	39	72	$0,66 \cdot 10^6$
	C	264	264	$18,4 \cdot 10^6$	39	84	$0,77 \cdot 10^6$
Q-BAND	N	232	30	$3,23 \cdot 10^6$	20	62	$0,15 \cdot 10^6$
	P	200	109	$8,74 \cdot 10^6$	20	34	$0,082 \cdot 10^6$

Die oben dargestellten Daten weisen hinsichtlich der Linienbreite H_e einen maximalen Fehler von 1 % im X-BAND bzw. 2 % im Q-BAND auf.

Die unterschiedlichen Linienbreiten des Exchangesignals (H_e) des N- bzw. P-Systems können somit als signifikant betrachtet werden.

Die Linienbreiten H_m wurden Computerplots entnommen, welche gegenüber den in Abb. 5.1 dargestellten vergrößert waren. Trotzdem bedingt das Rauschen in diesen Spektren vor allem im Q-BAND eine Unsicherheit von größer als 10 %.

5.2 Vergleich der ESR-Daten mit den $^{54}\text{Mn}^{++}$ -Bindungsdaten

Die Berechnung der ESR- Mn^{++} -Bindung erfolgt in drei Schritten (vgl. Abschnitt 4.4):

- a) Aus der Signalintensität von 2mM MnCl_2 bezogen auf die ESR-Verstärkung 10/100 ergibt sich

$$E^X = 7,95 \cdot 10^{-8} (\text{mM}) \quad E^Q = 61 \cdot 10^{-8} (\text{mM})$$

- b) Konzentration des gebundenen Mn^{++}

$$\text{Mn}_b^c = \underbrace{H_e^2 \cdot A_e \cdot E^i}_{\text{Exchange-}} + \underbrace{6 \cdot H_m^2 \cdot A_m \cdot E^i}_{\text{Matrix-Anteil}} \quad i = X, Q$$

c) Menge des gebundenen Mn^{++} , bezogen auf mg Protein:

$$Mn_b = Mn_b^c / C_{mito} \quad (U) \quad U = nmol/mg \text{ Protein}$$

Tabelle 5.2: Quantifizierung der mitochondrialen Mn-Spektren

ESR				^{54}Mn "Gesamtbindung"	ESR "Gesamtbindung"
Exchange(U)		Matrix(U)	$\frac{\text{Matrixbindung}}{\text{Gesamtbindung}} \%$	$^{54}Mn(U)$	$^{54}Mn(U)$
X-BAND	N	33,3	2,0	5,8	35,3
	P	127	1,1	0,86	128
	C	24,7	1,0	4,0	25,7
Q-BAND	N	40	1,8	4,7	41,0
	P	117	1,0	0,94	115

Wie man den letzten beiden Spalten der Tabelle 5.2 entnimmt, besteht im X-BAND und Q-BAND zwischen den ESR- und Mn-Bindungsdaten beste Übereinstimmung. Diese Übereinstimmung garantiert, daß alles gebundene Mn^{++} auch im ESR-Spektrometer sichtbar wird, sich also nicht in einer überbreiten (> 900 Gs) Linie, vergleichbar dem EDTA-Mn, "versteckt".

In der 3. Spalte der Tabelle 5.2 ist der prozentuale Anteil der Matrixbindung an der Gesamtbindung dargestellt. Er überschreitet in keinem System die 6 % Grenze.

Bemerkenswert ist, daß der Matrixanteil des P-Systems gegenüber dem N-System entscheidend vermindert ist ($0,86 \leftrightarrow 5,8$). Hier manifestiert sich ein wesentliches Unterscheidungskriterium zwischen P- und N-System. Rechnet man mit einem mitochondrialen Matrixvolumen von $5 \mu l/mg$, so ergibt sich eine Mn-Konzentration im Matrixraum von kleiner $1mM$.

Beim Übergang vom X-BAND in das Q-BAND ändern sich, wie man der Tabelle 5.1 entnimmt, sowohl die Amplituden als auch die Linienweiten der Matrix- und Exchange-Fraktion. So liegt es nahe, eine Größe ausfindig zu machen, die unabhängig von der Frequenz und unabhängig von dem Problem der Eindringtiefe im Q-BAND ist.

Das Verhältnis Matrix-Bindung zu Gesamt-Bindung hat diese Eigenschaft.

Wie man der 3. Spalte von Tabelle 5.2 entnimmt, bleibt das beschriebene Verhältnis beim Übergang in das Q-BAND innerhalb eines Systems weitgehend konstant. Die auftretenden Abweichungen ($5,8 \rightarrow 4,7$ bzw. $0,86 \rightarrow 0,94$) erklären sich aus der mit 10 % Fehler behafteten Bestimmung der Linienbreiten der Matrixsignale.

Stark verbreiterte Signale könnten im X-BAND durch die Zerlegung nicht aufgelöst werden, sie würden aber, wie in Abschnitt 3.4.3 gezeigt, im Q-BAND ein Sextett ergeben und damit den Wert des oben definierten Verhältnisses drastisch vergrößern. Da dies ersichtlich nicht der Fall ist, und außerdem die ESR- und Mn-Bindungsdaten im X-BAND bestens übereinstimmen, darf gefolgert werden, daß alles gebundene Mn^{++} im ESR-Spektrometer nachgewiesen wird.

5.3 Folgerungen aus dem Vergleich der X- und Q-BAND-Messungen

(1) Exchange Verhalten

Von entscheidender Bedeutung für alle weitergehenden biologischen Interpretationen der ESR-Daten ist das Verhalten der Exchange-Fraktion hinsichtlich ihrer Linienbreite beim Übergang vom X-BAND in das Q-BAND, in den beiden Systemen N und P.

Die in Tabelle 5.1 aufgeführten Daten weisen für das N-System eine Zunahme von H_e ($218 \text{ Gs} \rightarrow 232 \text{ Gs}$), für das P-System hingegen eine Abnahme ($228 \text{ Gs} \rightarrow 200 \text{ Gs}$) beim Übergang nach höheren Frequenzen aus.

Da der Zuwachs bzw. die Abnahme in beiden Systemen sehr klein sind, ihre Signifikanz aber von entscheidender Bedeutung für die weitere Interpretation ist, soll noch eine über die Computerzerlegung hinausgehende Begründung für die Gültigkeit dieser Daten gegeben werden.

In allen Messungen beobachtet man beim Übergang vom X-BAND in das Q-BAND, daß die Exchangeamplitude des N-Systems weit stärker abnimmt als diejenige des P-Systems.

Die Auswertung von 3 verschiedenen Messungen, normiert auf gleiche Verstärkung und Proteinkonzentration, ergab als Mittelwerte für die Exchangeamplitude:

$$\frac{A(N)^Q}{A(N)^X} = 0,076 \qquad \frac{A(P)^Q}{A(P)^X} = 0,13$$

Fordert man, daß sich die Signalintensitäten beider Systeme beim Übergang in das Q-BAND im gleichen Verhältnis vermindern (vgl. Tabelle 5.1), so können diese Daten nur so interpretiert werden, daß der Übergang in das Q-BAND im N-System zu einer Linienverbreiterung und im P-System zu einer Linienverschmälerung führt.

Obwohl andere Autoren (35,36) die Austausch-Wechselwirkung in die Berechnung der Linienbreiten von Radikalen in Flüssigkeiten einbezogen und zu einer guten Übereinstimmung zwischen Theorie und Meßwerten kamen, unterbleibt im vorliegenden Falle die Aufnahme des auf die Austausch-Wechselwirkung zurückgehenden Relaxationsterms. So behaupten wir mit Gunter (4), daß die beobachtete Linienverschmälerung im "Exchange-Signal" auf eine Austausch-Wechselwirkung zurückzuführen ist.

(2) Matrix-Verhalten

Aus den Werten für $H_m^X(I)$ und $H_m^Q(I)$ mit $I = N, P$ kann nun mit Hilfe der in Abb. 3.6 dargestellten Kurven auf die Parameter τ_z und Δ geschlossen werden.

Tabelle 5.3: Korrelationszeit und Kristallfeldparameter des Matrixsignals

	Linienbreite des Matrixsignals (Gs)		τ_c (ps)	Δ (Gs)
	X-BAND	Q-BAND		
P	39	20	6,31	250
N	39	20	6,31	250

Die Zunahme von τ_c und Δ in der Matrixfraktion gegenüber den Werten einer 2mM $MnCl_2$ -Lösung: ($\tau_c = 4ps$, $\Delta = 150$ Gs (26)) hat 2 Ursachen.

- (a) größere Viskosität des Matrixraums, siehe auch Puskin (32)
- (b) schwache Komplexbildung des Matrix-Mn mit Liganden wie ADP, ATP und löslichen Proteinen (26,27,28)

An dieser Stelle sei noch mitgeteilt, daß das Signal des extra-mitochondrialen Mn^{++} , welches ohne Zugabe von EDTA beobachtbar ist, trotz der hohen Konzentration der Mitochondrien-Suspension eine Linienbreite von nur 27,8 Gs hat.

5.4. Weitere ergänzende ESR-Messungen

5.4.1 Fortsetzung der ESR-Messungen zu niedrigeren Proteinkonzentrationen, pH-Abhängigkeit des ESR-Signals

Die im oben beschriebenen Experiment verwendeten Proteinkonzentrationen lagen im Bereich 50 mg/ml und damit um einen Faktor 5 über den von Puskin (4) für X-BAND-Messungen verwendeten Konzentrationen.

Messungen an N- und P-Systemen bei 10 mg/ml ergaben aber hinsichtlich der beiden Kriterien

$$(H_e(N))_X \ll (H_e(P))_X \text{ und Matrixanteil (P)} \ll \text{Matrixanteil (N)}$$

die gleichen Ergebnisse wie im hohen Konzentrationsbereich. Hiermit kann ausgeschlossen werden, daß die beobachteten Effekte konzentrationsabhängig sind.

Die in Abschnitt 2.6 erwähnte pH-Abhängigkeit der Mn^{++} -Bindung äußert sich bei ESR-Messungen im N-System durch eine signifikante Zunahme von H_e bei gleichzeitiger drastischer Abnahme der Amplitude A_e , wenn man von pH 7.2 in Richtung höhere oder niedrigere pH-Werte geht. Dieser Effekt soll hier nicht weiter diskutiert werden.

5.4.2 Einfluß von DNP und Ruthenium Red auf das ESR-Spektrum

Wie schon von Chapell (15) und Puskin (4) beschrieben, führt die Zugabe von DNP zu Mn^{++} -beladenen Mitochondrien (N-System) zu einem schnellen Release von Mn^{++} .

Beobachtet man das zeitliche Verhalten des ESR-Spektrums eines N-Systems (10 mg/ml oder auch 50 mg/ml) nach Zugabe von 10 U DNP, so zeigt es das folgende Verhalten:

Bereits nach 30 Sek. erfolgt eine sichtbare Abnahme der Exchange-Amplitude, gleichzeitig steigt die Matrix-Amplitude an. Im weiteren Verlauf (3-10 Min.) vergrößert sich die Exchange-Linienbreite um gut 20 %, die zugehörige Amplitude beträgt nur noch ca. 20 % des Anfangswertes (Abb. 5.2).

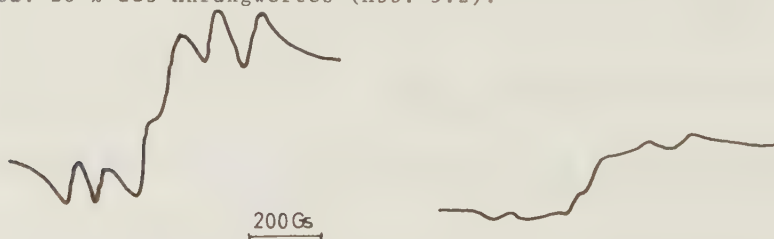


Abb. 5.2: Zeitliches Verhalten der Exchange-Fraktion nach Zugabe von DNP

RLM + 250 U Mn $\xrightarrow{10'}$ EDTA

15 Min. nach Zugabe von 1 U DNP

Im Gegensatz dazu steht das Verhalten der Exchangefraktion im P-System: Zugabe von DNP verringert die Amplitude nur geringfügig (Release eines evtl. N-Anteils?!), der Matrixanteil steigt um etwa 10 %.

Zugabe von DNP oder Ruthenium Red vor der Inkubation der Mitochondrien mit Mn^{++} verhindert, wie in Abschnitt 2.4 gezeigt, drastisch die Mn^{++} -Bindung. Als Ort der Bindung weisen die ESR-Spektren solcher Systeme eindeutig den Matrixraum aus.

Zusammenfassend kann man sagen:

DNP,RR,FCCP ermöglichen ein Eindringen von Mn^{++} -Ionen in den Matrixraum, verhindern aber die Ausbildung einer Exchangefraktion.

Eine infolge der Mn^{++} -Akkumulation gebildete Exchangefraktion hingegen kann im P-System nicht mehr durch DNP oder FCCP abgebaut werden, während dies im N-System möglich ist.

Die Exchangefraktion des P-Systems muß mithin einem anderen mitochondrialen Zustand zugeordnet werden als diejenige des N-Systems!!

5.4.3 Membranintegrität und ESR-Spektrum

Im folgenden soll gezeigt werden, daß die Ausbildung einer Exchangefraktion zwingend an die Integrität der inneren Mitochondrienmembran gebunden ist.

Die Ergebnisse von ESR-Messungen an verschiedenen Membranen sind in Tabelle 5.3 dargestellt. Die Literaturangaben verweisen auf die in der Literatur angegebenen Präparationsverfahren.

Tabelle 5.3: ESR-Messungen an verschiedenen Membranpräparationen	Amplitude des Exchange-signals, bezogen auf unbehandelte RLM bzw. BHM
(1) nach Tieffrieren von BHM aufgetaute Membran	20 %
(2) Beschallte Membran aus: frischen BHM "SMP" (37) aufgetaute BHM	0 % 0 %
(3) Vesikel aus: extrahierten mitocho. Lipiden (38) Cardiolipid	0 % 0 %
(4) Digitonin präparierte RLM (39)	100 %

Digitonin präparierte RLM zeichnen sich vor den normal präparierten RLM durch den Verlust der äußeren Mitochondrienmembran aus. Die nachgewiesene Exchangefraktion dokumentiert die Bedeutungslosigkeit der Außenmembran bezüglich der Mn-Bindung.

In den Fällen (1) und (2) sind wesentliche Funktionen der Membran wie Atmungskontrolle, Schwellen-Schrumpfen und ADP-Transport verlorengegangen bzw. stark beeinträchtigt. Der Verlust der Membranintegrität ist also eng mit der Fähigkeit der Mn-Akkumulation gekoppelt!

5.5 Zusammenfassung und Modellbildung

Die in diesem Abschnitt aufgeführten Ergebnisse im N-, P- und C-System sollen nun zusammengefaßt und zur Aufstellung eines Modells herangezogen werden.

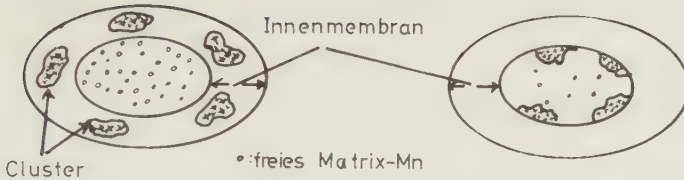
P- und N-System unterscheiden sich durch die folgenden 4 Kriterien:

- (a) Das P-System bindet mehr Mn^{++} im Exchangesignal als das N-System
- (b) Das Verhältnis Matrixbindung zur Gesamtbindung ist für das P-System kleiner als für das N-System
- (c) Die Linienbreiten der Exchangefraktion verhalten sich nach folgendem Schema:

$$\begin{array}{ccc} H(P)^X & > & H(N)^X \\ \vee & & \wedge \\ H(P)^Q & < & H(N)^Q \end{array} \quad H(N)^X < H(P)^X < H(C)^X$$

- (d) DNP vermag nur im N-System das Exchangesignal abzubauen.

Aufgrund dieser Daten werden nun den Mitochondrien zwei unterschiedliche Zustände zugewiesen.



N-System

P-System

Bildung von Mn-Clustern in der inneren Mitochondrienmembran. EDTA unzugänglich müssen diese Cluster im Lipidbereich angesiedelt sein.

Gleichzeitige Zugabe von Ca^{++} vergrößert die mittleren Abstände zwischen Mn^{++} -Ionen, daraus folgt die beobachtbare Linienverbreiterung (c) (siehe auch (4)).

Es bilden sich Präzipitate von Hydroxyapatit $(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)_3 \text{Ca}(\text{OH})_2$ (10) im Matrixraum oder an der Innenseite der Innenmembran.

Diese Komplexierungsreaktion hält den Anteil des freien Matrix-Mn^{++} niedrig.

Zugabe von DNP, FCCP, RR vor der Mn-Akkumulation verhindert die Ausbildung von Mn-Clustern bzw. Präzipitaten durch:

- aa) Einfluß auf den pH-Gradienten im Falle DNP, FCCP (40).
- bb) Blockade des Ca-Mn-Carriers durch Ruthenium Red (14).

Im nächsten Abschnitt soll durch weitere Experimente mit Fettsäure-Spinlabeln dieses Modell erhärtet werden.

6. Spinlabel-Mn⁺⁺-Wechselwirkung in der Mitochondrien-Membran

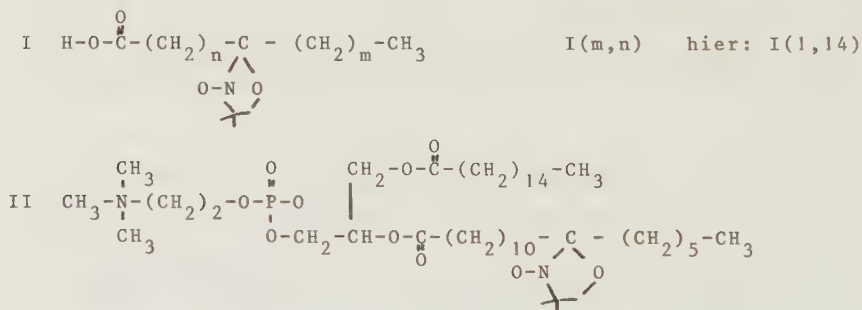
6.1 Spinlabel in biologischen Membranen

Die Mitochondrien-Membran besteht wie jede andere biologische Membran in ihrer Grundstruktur aus einem Lipid Bilayer, dem zur Innen- und Außenseite hin eine Proteinschicht anliegt (41).

Sieht man von den Eisen-Schwefel-Proteinen (42) und einigen Radikalen (35) ab, die ein ESR-Signal ohne Zutun von außen ergeben, so bleibt zur Strukturaufklärung der Membran nur die Inkorporation spezieller Ionen (Mn⁺⁺!), aber auch Moleküle, welche mit einem Spinlabel versehen sind.

Zum Einsatz kommen Fettsäure-, Phospholipid- und Cholesterin-Spinlabel (43). Diese Spinlabel werden in natürliche Membranen (44,45) und künstliche Membranen (43) eingebaut.

In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich das N - oxyl-4', 4'-dimethyl Oxazolidin (NODO) Derivat der Palmitinsäure und des Phosphotidyl-cholins eingesetzt.



Label I wurde von Synva, Palo Alto, Calif. bezogen.

Label II wurde mir von Dr.D. Barker, University of Leeds, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

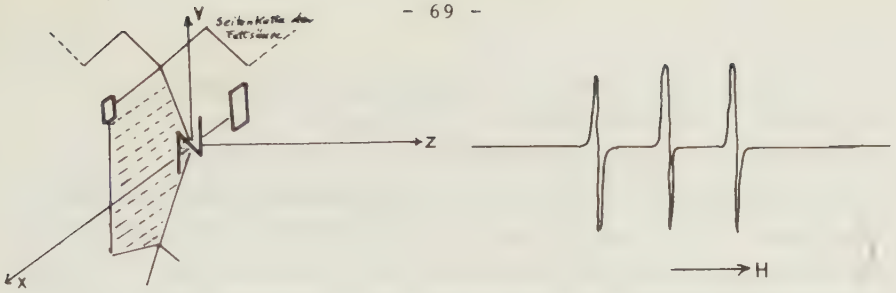


Abb.6.1: Orientierung des NODO-Rings und ESR-Spektrum

Wie man der Abb. 6.1 entnimmt, liegt der NODO-Ring in der x-y Ebene. Ein ungepaartes Elektron befindet sich im $2p\pi$ Orbital des N-Atoms, welches sich in z-Richtung (=Richtung der Molekülachse) erstreckt.

Durch die Kontakt- und Dipol-Dipol-Wechselwirkung des einzelnen Elektronenspins mit dem Kernspin des ^{14}N -Atoms ($I=1$) ergibt sich eine Hyperfeinstrukturaufspaltung.

Die zu beobachtenden ESR-Spektren eines solchen Labels lassen sich durch den folgenden Spin Hamilton-Operator beschreiben (46).

$$\hat{H} = |\beta| \hat{S} g \hat{H} + \hbar \hat{S} T \hat{I} + g_n \beta_n \hat{I} \hat{H}$$

g, T sind die Tensoren des g-Faktors und der Hyperfein WW, β, β_n Elektron- und Kernmagneton

Dabei weisen die Hauptachsen von g und T in die gleiche Richtung. Bezüglich des oben angegebenen Koordinatensystems gilt (47):

$$\begin{aligned} g_{\perp} &:= g_{xx} = g_{yy} = 2.0073 \\ g_{\parallel} &:= g_{zz} = 2.0021 \\ T_{\perp} &:= T_{xx} = T_{yy} = 5,8 \text{ MHz} \\ T_{\parallel} &:= T_{zz} = 30,8 \text{ MHz} \end{aligned}$$

In niedrig viskosen Flüssigkeiten führt der Spinlabel eine nahezu isotrope Rotationsbewegung aus, die zugehörige Korrelationszeit τ_r liegt im Bereich um lps.

Die beobachtete Hyperfeinstrukturaufspaltung ist nur durch $a = \frac{1}{3} \text{Spur (T)}$ bestimmt, wobei a - im Gegensatz zu g - mit der Polarität des Lösungsmittels zunimmt (48).

Der in künstliche oder natürliche Membranen inkorporierte Spinlabel kann infolge der ihm durch die Bilayerstruktur aufgezungenen Nahordnung nicht mehr isotrope Rotationen ausführen. Da die polare Gruppe der Fettsäure in der Membran-Wasser-Grenzfläche verankert ist, wird die Fettsäure und damit der Label hauptsächlich um die z -Achse rotieren.

Die anisotrope Rotation des Labels äußert sich in einer auffälligen Verbreiterung der drei beobachtbaren ESR-Linien; in der Reihenfolge Hochfeld > Tieffeld > Mittelfeld (43). Sind die Freiheitsgrade der Rotation stark eingeschränkt, so treten zusätzliche Linien auf (44). Die Auswertung solcher Spektren erlaubt die Berechnung des von Seelig (49) eingeführten Strukturparameters. Letzterer wiederum steht in engem Zusammenhang mit dem Ordnungszustand der Umgebung des Spinlabels.

Die Berechnung der Rotationskorrelationszeit τ_r des inkorporierten Spinlabels müßte die anisotrope Rotation des Labels in der Membran berücksichtigen (43). Unter der Annahme einer nahezu isotropen Rotation hat Keith (45) für τ_r der Fettsäure-Spinlabel in Neurospora Mitochondrien die folgende Formel angegeben:

$$\tau_r = 6,5 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta H_o^{pp} \cdot (\Delta H_{-1}^{pp} / \Delta H_o^{pp} - 1)$$

ΔH_o^{pp} : Ausdehnung der Mittelfeld-Linie in Feldrichtung, gemessen von Maximum bis Minimum

ΔH_{-1}^{pp} : entsprechend für die Hochfeld-Linie

6.2 Spinlabel-Mn⁺⁺-Wechselwirkung

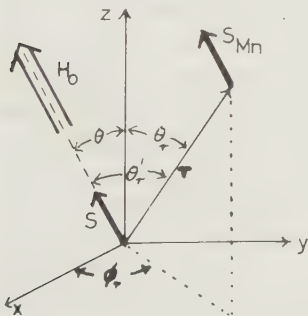
Die Spinlabel-Untersuchungen dieser Arbeit sollten weiteren Aufschluß über die Lokalisation des von den Mitochondrien akkumulierten Mn⁺⁺ ergeben.

Nach der Diskussion der in Abschnitt 5 dargestellten Ergebnisse wird das akkumulierte Mn⁺⁺ der Innenmembran zugeordnet. Fettsäure-Spinlabel binden ebenfalls an die Membran (siehe Abb. (6.5)) und werden nach Keith (43) in der Bilayerphase der Membran eingebaut. So liegt es nahe, eine Wechselwirkung zwischen Spinlabel und Mn⁺⁺ zu erwarten. Solch eine Wechselwirkung wurde von Azzi (50) bei der Untersuchung der membrangebundenen ATP-ase beobachtet.

Mehrere Autoren (51,52) benützen diese Spin-Spin-Wechselwirkung zwischen spinlabelmarkierten Enzymen und deren Mn⁺⁺-bindenden Substraten, um Aussagen über die Geometrie des aktiven Zentrums zu erhalten. Der Spin des Mn⁺⁺-Ions induziert nach Leigh (52) durch seine Relaxation via Dipol-Dipol-Wechselwirkung die Relaxation des Spinlabel-Spins.

Unter der Voraussetzung, daß sich die Orientierung der beiden Spins während der Lebensdauer der beiden Spinzustände nicht ändert, kann die zugeordnete Korrelationszeit τ_c mit T_1 (Mn) identifiziert werden.

Nach Berechnungen von Leigh (52) verursacht die Dipol-Dipol-Wechselwirkung der beiden Spins primär eine Linienverbreiterung des Spinlabel-Spektrums.



δH = Linienbreite einer Hyperfeinstruktur-Linie

$$\delta H(\theta_r') = \frac{2\beta\mu^2\tau_c}{r^6} (1 - 3\cos^2\theta_r')^2 + \delta H_0$$

C

δH_0 = Linienbreite ohne Dipol-Dipol-Wechselwirkung

Abb. 6.2: Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen zwei Spins

Eine von Leigh durchgeführte Computersimulation über alle Winkel (θ, ϕ), welche H_0 mit der z-Achse des Spinlabel-Koordinatensystems einschließen kann, und mit den Winkeln (θ_r, ϕ_r), welche die Lage von Mn^{++} bestimmen, ergibt, daß sich nur entsprechend der Wahl von $C=C(r)$ die Amplituden erniedrigen, aber keine Linienverbreiterungen zu beobachten sind.

Diese Berechnungen sind in Einklang mit den Beobachtungen der oben angeführten Autoren (50,51,52) sowie mit den von mir unten zu beschreibenden Messungen.

Eine exakte Bestimmung von r ist nicht das Ziel dieser Arbeit. Voraussetzung dazu wäre die Kenntnis der Parameter T_2 und T_1 (Mn), die aus den Membranmessungen nur schwer zu erhalten sind. Darüber hinaus müßten die Spinlabel-Spektren simuliert werden.

Im folgenden soll darum allein aus der Tatsache einer Amplitudenverminderung des Spinlabel-Signals auf die unmittelbare Nachbarschaft zwischen Spinlabel und Mn^{++} -Ion geschlossen werden.

6.3 Inkorporation des Spinlabels und Membranfunktion

Gibt man Label I zu Mitochondrien, so muß vorab geklärt werden, wie groß die Bindung des Labels als Funktion der Zeit und des pH ist.

Mangels eines radioaktiv markierten SL muß der Grad der Bindung aus dem Signal des im Überstand verbliebenen SL geschlossen werden. Als Bezug dient eine 0,01 mM SL-Lösung in Puffer.

Dieses Referenzsignal erweist sich als stark pH-abhängig Abb. 6.3. Die Zunahme der Signalamplitude mit dem pH kann nach einem Vorschlag von Dr.D. Barker folgendermaßen erklärt werden:

Bei pH 6 liegt ein Großteil der Fettsäure-SL in der Form der freien Säure vor, es kommt zur Micellen-Bildung, die damit verbundene Dipol-Dipol-Wechselwirkung verbreitert die ESR-Linien bis zur "Unsichtbarkeit".

Mit zunehmenden pH geht infolge der großen Löslichkeit immer mehr Fettsäure in die ionisierte, hydrophile Form über:

Die Dipol-Dipol-Verbreiterung nimmt ab.

In Abb. 6.4 ist die pH-Abhängigkeit der Fettsäure-SL-Bindung nach 4 Min. dargestellt. Die Bindung des Fettsäure-SLs ist bei pH 7 maximal. In Gegenwart des Entkopplers DNP, welches den von innen nach außen gerichteten Protonengradienten (40) zusammenbrechen läßt, erfolgt eine Bindungserniedrigung. Es darf daraus geschlossen werden, daß die Fettsäure-Inkorporation in geringem Maße vom Membranpotential abhängt.

Da der Einbau des SL in die Membran ein Eingriff in ihre Integrität darstellt, war es notwendig, den Konzentrationsbereich des SL ausfindig zu machen, für den die Funktionen der Mitochondrien (Abschnitt 2.2) erhalten bleiben und für den gleichzeitig ein ESR-Signal nachweisbar ist. Von entscheidender Bedeutung für die Beobachtbarkeit einer SL-Mn^{++} WW ist dann zusätzlich, daß die Mn^{++} -Akkumulation erhalten bleibt!

Vonden über 20 unternommenen SL-Versuchen an RLM und BHM erfüllt die folgende Anweisung die geforderten Voraussetzungen:

Nach dem letzten Waschgang innerhalb der RLM- bzw. BHM-Präparation werden 2ml Suspension von 50mg/ml 15 Min. lang mit 60nmol Label I bzw. II inkubiert. Nach der Atmungskontrolle an der

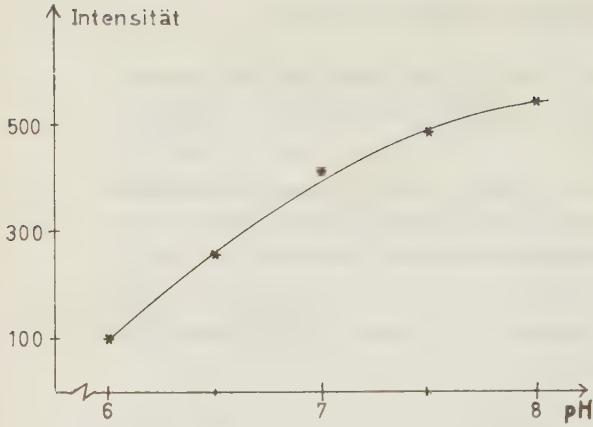


Abb. 6.3: Signalintensität einer Hyperfeinstruktur-Linie von Label I in Puffer in Abhängigkeit von pH.

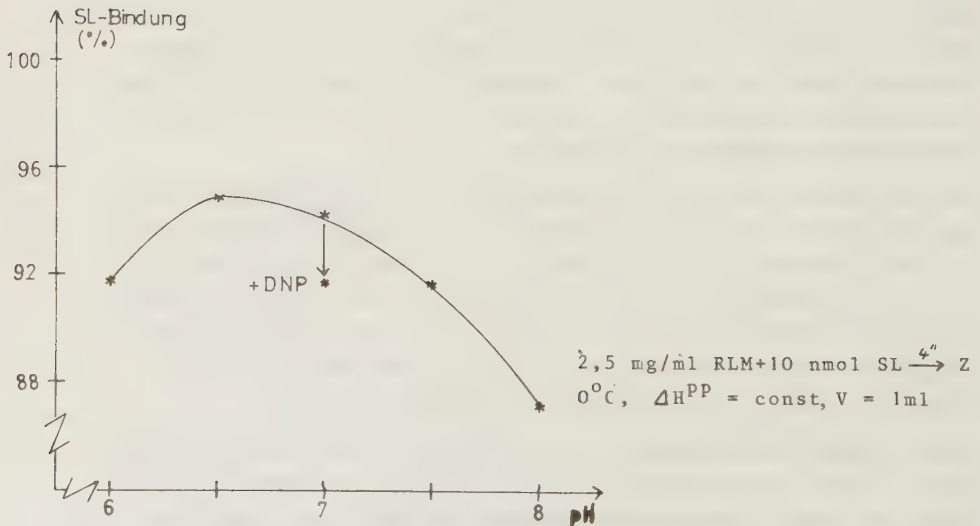


Abb. 6.4: Bindung von Label I an RLM in Abhängigkeit von pH

Sauerstoffelektrode (wird nach 1h wiederholt!) wird die Suspension auf 20 mg/ml verdünnt.

6.4 Ergebnisse und Diskussion

Das ESR-Spektrum der mit I inkubierten RLM entnimmt man der Abb. 6.5. Die starken Linienverbreiterungen lassen, wie in Abschnitt 6.1 ausgeführt, auf eine anisotrope Bewegung der Fettsäure schließen. Unter Benützung der dort angegebenen Formel ergäbe sich: $T_r = 1,7 \cdot 10^{-9}$ s. Dieser Wert darf nach Keith (43) nur als Richtwert betrachtet werden.

Das SL-Signal erweist sich bei 21°C über einen Zeitraum von 20 Min. als zeitlich konstant, danach tritt ein merklicher Abfall ein. Zugabe von $K_3Fe(CN)_6$ vergrößert das Signal um 60 % durch Oxidation derjenigen Spinlabel, welche durch mitochondriale Atmungsketten-Komponenten chemisch reduziert wurden. Da $K_3Fe(CN)_6$ in der verwendeten Konzentration von 5mM die Mn^{++} -Akkumulation hemmt, darf es erst nach dem EDTA-Stop zugegeben werden.

Abb. 6.6 zeigt das ESR-Spektrum des SL nach der Zugabe von Mn^{++} . Bei unveränderter Linienbreite nimmt die Amplitude um mehr als 20 % ab! Der Abstand des Mn^{++} vom Fettsäure-SL muß demnach so klein sein, daß die Dipol-Dipol-Wechselwirkung der beiden Spins die von Leigh postulierte Amplitudenverminderung erzeugt. Verhindert man durch Zugabe von DNP die Mn^{++} -Akkumulation (Abschnitt 2.4), so findet keine Amplitudenreduktion des SLs statt.

Im Kontrollexperiment werden die RLM mit Ca^{++} inkubiert, nach dem EDTA-Stopp wird Mn^{++} zugegeben. Auch in diesem Fall beobachtet man keine SL-Amplituden-Reduktion: das außerhalb der Mitochondrien befindliche Mn^{++} hat einen zu großen Abstand vom membrangebundenen SL, als daß es mit dem SL in eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung treten könnte.

In Tabelle 6.1 sind alle weiteren Experimente aufgeführt.

Tabelle 6.1: SL-Mn-Wechselwirkung im P- und N-System

Reduktion der Signalamplitude in % gegenüber der Kontrolle		
	Label I	Label II
Mn ⁺⁺	30	25
Mn ⁺⁺ +PO ₄	5	0
Mn ⁺⁺ +DNP	0	Label in nicht ausreichender Menge vorhanden
Mn ⁺⁺ + RR	5	

9.51 GHz, 3380 Gs, Mod. 2 Gs, 100 mW

Label I: 200 μ l von 24 mg/ml RLM + S + $\xrightarrow[\text{Ca}]{\text{Mn}} \text{EDTA} + \text{Mn}^{++}\text{Fe}(\text{CN})_6^{---}$
Mn=100U, Ca=100U, EDTA=200U, RR=10U, DNP=20U, K₃Fe(CN)₆=200U,
PO₄ = 100U

Label II: 200 μ l von 15 mg/ml RLM + S + $\xrightarrow[\text{Ca}]{\text{Mn}} \text{EDTA} + \text{Mn}$
Mn=75U, Ca=75U, EDTA=166U, PO₄=166U

Beide Meßreihen wurden mit den Labeln I und II an RLM durchgeführt. Atmungskontrolle und Mn⁺⁺-Akkumulation entsprachen den SL-freien Kontroll-Mitochondrien. Messungen an BHM führten zu gleichen Ergebnissen.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich wie folgt interpretieren:

- In Gegenwart von PO₄ (P-System) findet keine Reduktion der SL-Amplitude statt, da alles Mn⁺⁺ in Form eines Präzipitats im Matrixraum vorliegt. Dieses Mn⁺⁺ ist damit außer Reichweite des SL-markierten Membran-Innenraums.
- Ohne PO₄ (N-System) tritt eine Signalreduktion bis zu 30 % auf: Mn⁺⁺ und damit die in Abschnitt 4 postulierte Exchange-Fraktion ist in der Nähe der SL lokalisiert. Da die Fettsäure- und Phospholipid-SL im Lipidbereich der Membran eingebaut werden, müssen die in Abschnitt 5.5 postulierten Mn⁺⁺-Cluster dieser Lipidschicht zugeordnet werden.

c) DNP und Ruthenium Red verhindern die Ausbildung einer Exchangefraktion (Abschnitt 5.4.2); so wird es verständlich, daß in ihrer Gegenwart keine Signalreduktion des SLs zu beobachten ist. Erst jetzt kann als gesichert gelten, daß die unspezifische (geringe) Mn^{++} -Bindung in Gegenwart dieser Inhibitoren nicht dem Membran-Inneren, sondern dem Matrixraum zuzuordnen ist!

Es bleibt nun zu zeigen, ob das in Abschnitt 5.5 beschriebene Cluster-Modell die beobachtete SL-Mn-Wechselwirkung erklären kann.

Aus den Daten der Mitochondrien-Oberfläche $O = 10 \text{ m}^2/\text{ml}$ (Matrixvolumen) (53), dem Matrixvolumen $V_m = 1 \text{ } \mu\text{l}/\text{mg}$ Protein und der Dicke der Lipidphase ($D = 60 \text{ \AA}$) läßt sich das Volumen pro Ion in der Lipidphase berechnen (vgl. Fußnote nächste Seite).

Nimmt man eine Gleichverteilung der Mn^{++} -Ionen über die Lipidphase an, so erhält man bei kubischer Anordnung der Ionen einen Abstand zwischen den nächsten Nachbarn von:

$$d_{Mn-Mn} = \sqrt[3]{\frac{D \cdot O \cdot V_m}{6 \cdot Mn_b} \cdot 10^3} \text{ \AA}$$

Rechnet man mit den oben angegebenen Daten für D, O, V_m , eingedenk der Tatsache, daß solche Daten mit großen Fehlern behaftet sein können, so erhält man:

$$d_{Mn-Mn} = 10 \text{ \AA};$$

Dieser Abstand der Mn^{++} -Ionen ist viel zu groß um die in der Exchangefraktion beobachtete Austausch-Wechselwirkung zu verursachen. Die Einführung von Clustern schafft hier Abhilfe:

Es sollen nun folgende Annahmen gemacht werden: In jeden Cluster ist, unabhängig von seiner Größe, der Abstand nächster Nachbarn konstant (d_c). Die Zahl der Ionen pro Cluster, bzw. das Cluster-Volumen, kann einer beliebigen Verteilung folgen, da nur das Verhältnis aus Gesamtvolumen der Cluster und dem Volumen der Lipidphase für die weiteren Betrachtungen von Bedeutung ist.

$$L_C = \frac{\text{Gesamt volumen der Cluster}}{\text{Volumen der Lipidphase}} = 0,6 \frac{Mn_b \cdot d_c^3}{D \cdot O \cdot V_m} \quad \%$$

Rechnet man mit einem für eine Austausch-Wechselwirkung sinnvollen Abstand von $d_c = 4 \text{ \AA}$, so erhält man $L_C = 7 \%$, d.h. 7 % der Lipidphase sind mit Mn-Clustern besetzt.

Wie man Abb. 6.5 entnimmt, zeigen die Spektren der inkorporierten Fettsäure-SL nur die übliche Linienverbreiterung, verursacht durch die Immobilisation des Labels in der Membran. Eine Linienverschmälerung, welche auf eine Austauschwechselwirkung schließen ließe (44), ist nicht zu beobachten. Damit erscheint es gerechtfertigt, die FS-SL gleichmäßig auf das Volumen der Lipidphase zu verteilen. Man erhält wie oben $d_{SL-SL} = 55 \text{ \AA}$.

Wenn nun die Mn-Cluster 7 % des Lipidvolumens einnehmen, so überdecken sie mit Sicherheit mehr als 10 % der Spinlabel. Die beobachtete Abnahme des FS-SL-Signals erscheint somit plausibel.

Ableitung der auf Seite 74 angegebenen Formeln:

$$\begin{aligned} O &= 10 \text{ m}^2/\text{ml} & 1 \text{ ml Matrixvolumen hat eine Oberfläche von } 10 \text{ m}^2 \\ V_m &= 1 \text{ } \mu\text{l}/\text{mg} & \text{" " ist an einen Proteingehalt von } 1/1 \text{ g geknüpft} \\ & & \text{zu } 1/1 \text{ mg Protein gehört eine Matrixoberfläche von } \\ & & 10 \cdot 10^{17} \text{ \AA}^2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} D &= 60 \text{ \AA} & \text{zu } 1/1 \text{ mg Protein gehört ein Volumen von } 10 \cdot 60 \cdot 10^{17} \text{ \AA}^3 \\ Mn_b &= 100 \text{ nmol/mg} & 1 \text{ mg Protein bindet } 100 \cdot 6 \cdot 10^{14} \text{ Ionen} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volumen pro Ion in der Lipidphase: } V &= \frac{60 \cdot 10 \cdot 1 \cdot 10^3}{6 \cdot 100} \text{ \AA}^3 \\ \text{verallgemeinert: } V &= \frac{D \cdot O \cdot V_m}{6 \cdot Mn_b} 10^3 \text{ \AA}^3 \end{aligned}$$

x
3380 Gs

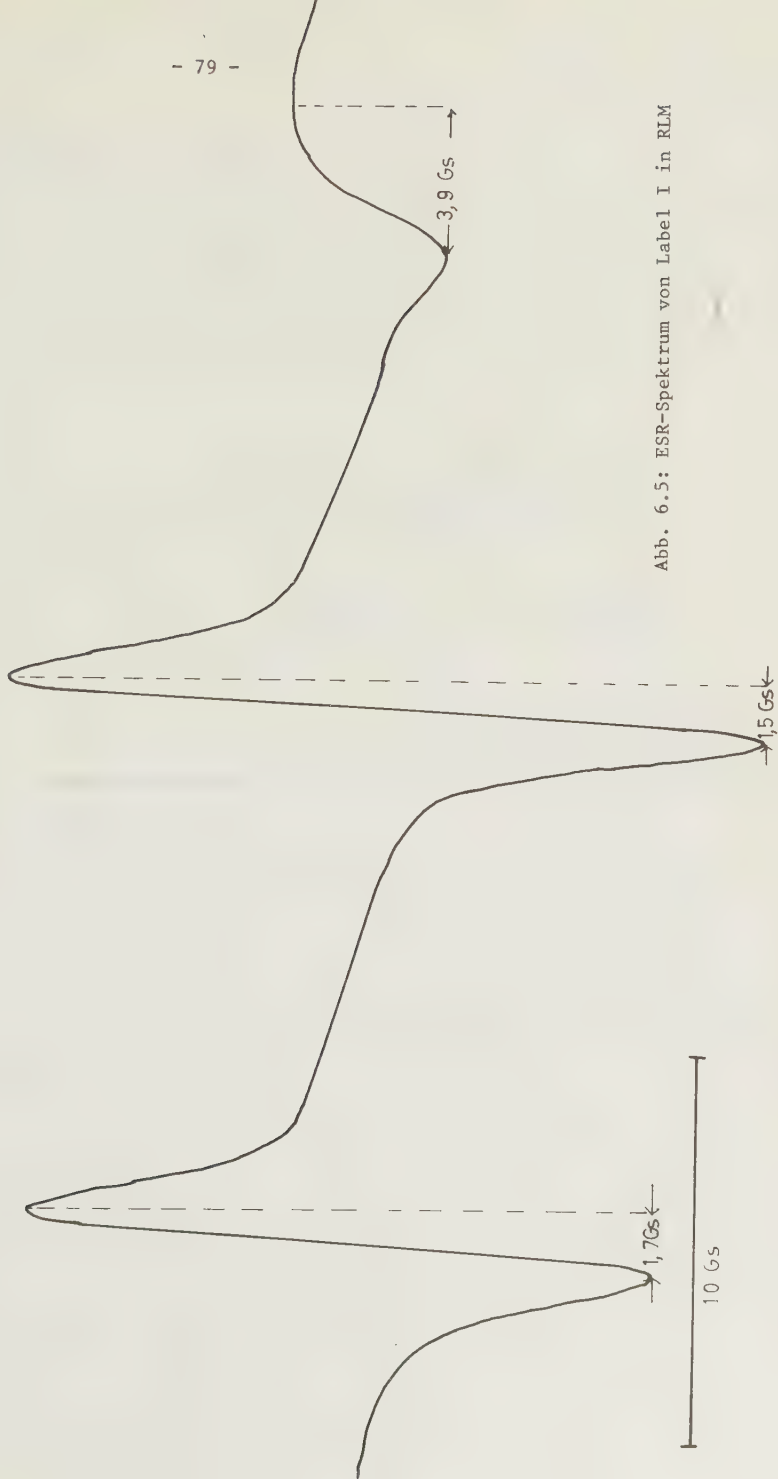


Abb. 6.5: ESR-Spektrum von Label I in RLM

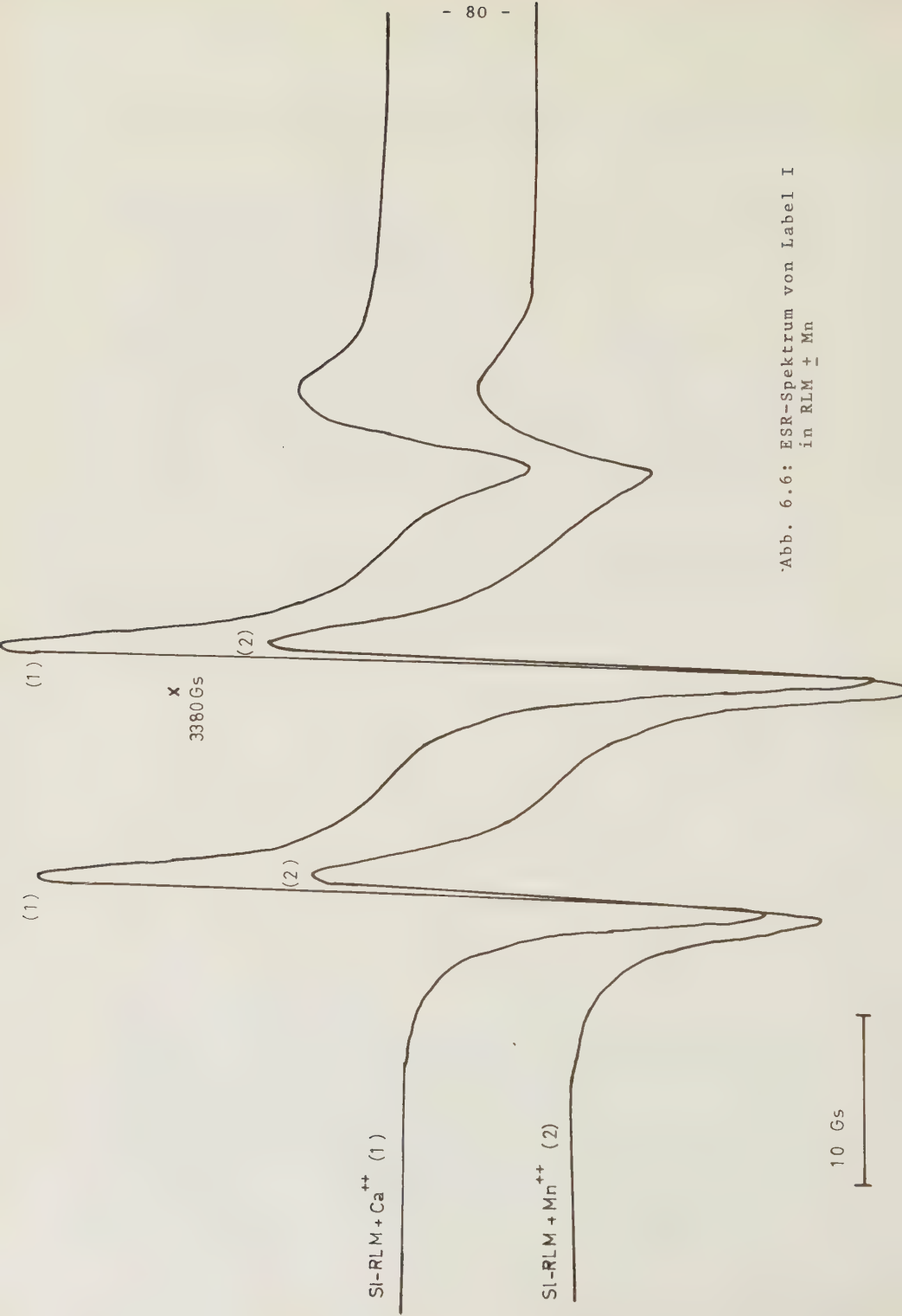


Abb. 6.6: ESR-Spektrum von Label I
in RLM + Mn

7. Zusammenfassung

- (1) Die radioaktiv markierte Mn^{++} -Bindung an RLM mit EDTA-Stopp erfasst nur Mn^{++} -Ionen, welche in EDTA unzugänglichen Membranbereichen lokalisiert sind. Bei pH 7,2 werden unabhängig von der Protein- und Mn^{++} -Konzentration maximal 100 nmol/mg Mn^{++} -Ionen aufgenommen. Diese können durch Ca^{++} ersetzt bzw. ausgetauscht werden, aber nicht durch Mg^{++} .
- (2) Mn^{++} , Ca^{++} und Mg^{++} beeinflussen in Konzentrationen bis 300 nmol/mg nur geringfügig die Atmungskontrolle und das Schwellen-Schrumpfen Verhalten der Mitochondrienmembran. Die Membranintegrität ist damit bis zu diesen Konzentrationen gewährleistet.
Die Stimulierung der O_2 -Aufnahme durch Ca^{++} in Gegenwart von PO_4 und Substraten kann nur mit Mn^{++} aber nicht mit Mg^{++} nachvollzogen werden.
Die vorliegenden Daten lassen es als ausreichend gerechtfertigt erscheinen, Ca^{++} -Ionen durch die ESR-nachweisbaren Mn^{++} -Ionen zu ersetzen.
- (3) Um den akkumulierten Mn^{++} -Ionen einen definierten Ort in der Mitochondrienmembran zuweisen zu können ist es von Vorteil, die ESR-Spektren im X- und Q-BAND zu untersuchen. Zusätzliche Informationen erhält man aus dem Vergleich der beiden Systeme N und P.
N-System: Mitochondrien + Mn^{++}
P-System: Mitochondrien + Mn^{++} + PO_4
- (4) Die Spektren der beiden Systeme müssen zunächst einer Computerzerlegung hinsichtlich ihres Matrix- und Exchange-anteils unterworfen werden. Hierzu erweist es sich als vorteilhaft, Mn^{++} -Spektren in wässrigen Lösungen zu simulieren. Die Berechnung der Mn^{++} -Spektren geschieht auf der Grundlage der Theorien von Redfield (23) und Hurd (18). Damit wird es möglich, aus dem Vergleich der Linienbreiten der simulierten und der Matrix-Spektren letzteren die Parameter $T_c = 6,3$ ps und $\Delta = 250$ Gs zuzuordnen. Der Zuwachs von T_c und Δ gegenüber den Werten einer 2mM $MnCl_2$ Lösung,

erklärt sich aus einer Komplexierung zwischen Mn^{++} und schwachbindenden Liganden wie ADN und Proteinen des Matrixraumes.

- (5) Die aus den ESR-Daten berechenbare Gesamtbindung ist in guter Übereinstimmung mit den Daten der radioaktiv markierten Mn^{++} -Gesamtbindung. Damit ist gesichert, daß alles gebundene Mn^{++} spektroskopisch sichtbar ist.

Der Matrixanteil an der Gesamtbindung bleibt unter 6 % und vermindert sich in Gegenwart von PO_4 auf 1 %.

In Übereinstimmung mit Gunter (4) hat das Exchangesignal des N-Systems eine um 4 % kleinere Linienbreite als dasjenige des P-Systems mit 228 Gs. Gleichzeitige Zugabe von Ca^{++} zum N-System führt zu einer wesentlichen Vergrößerung der Linienbreite auf 264 Gs.

Beim Übergang in das Q-BAND nimmt die Linienbreite des Exchangesignals im N-System zu (218 Gs $\rightarrow$ 232 Gs), während sie sich im P-System entgegengesetzt verhält (228 Gs $\rightarrow$ 200 Gs).

- (6) Nachträgliche Zugabe von DNP im N-System führt zu einer Linienverbreiterung und Intensitätsabnahme im Gegensatz zur Stabilität des P-Systems gegenüber DNP. In Gegenwart der Inhibitoren Ruthenium Red und La^{+++} wird keine Exchange-fraktion aufgebaut.

- (7) Das akkumulierte Mn^{++} tritt mit inkorporierten Fettsäure- und Phospholipid-Spinlabel in eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Die ESR-Signale dieser in der Lipidschicht der Innenmembran lokalisierten Label werden durch das akkumulierte Mn^{++} um 20 - 30 % vermindert. Es darf daraus gefolgert werden, daß der Abstand Mn-SL kleiner 10 Å ist.

In Gegenwart von PO_4 wird keine Signalreduktion beobachtet. Somit muß das akkumulierte Mn^{++} zumindest partiell aus der Lipidschicht verdrängt sein.

Bei einem exchangefähigen Abstand der Mn^{++} -Ionen von $d_c = 4\text{\AA}$ innerhalb eines Clusters wären 7 % der Lipidphase mit Clustern besetzt. Mit der Annahme einer Gleichverteilung der Spinlabel über die Lipidphase könnte damit die Signalreduktion durch Mn^{++} erklärt werden.

- (8) Aufgrund dieser Daten werden dem P- und N-System zwei grundlegend verschiedene Zustände der Mn^{++} -Bindung zugeordnet:

Im N-System bindet Mn^{++} in Form von Clustern, vergleichbar etwaigen Warteplätzen, in der Lipidphase der Innenmembran. Im P-System werden die Cluster umstrukturiert und in Richtung Matrixraum verlagert.

Eine mögliche Bindung zwischen Mn^{++} und Cardiolipin, welches in ausreichender Menge (37 nmol/mg) in der Innenmembran vorhanden ist (54), erscheint geeignet, einen Teil der in den Clustern auftretenden Raumladungen zu kompensieren.

Anhang I: ALGOL-Programm zur Spektren-Simulation

PROGRAMM

'BEGIN'

'REAL' H,H0Z,AA,MM,MM,C2,C4,X,Y,T,W,G,B,C,J,E,F,TE,Z,RDT,DELTA,
TC,Z1,Z1,HL,3B,NORM,DEL,DELTA,MAX,SS,MAT,NEF ;

'INTEGER' N,I,K,L,J,P,Q, S,TT,C1,C3,;

'ARRAY' AR(/1..4/) , BR(/1..4/) , IR(/0..2/),A(/1..5,1..5 /),H(/1..30/),
V, UJ, EV, DD(/1..5,1..5/), D, II(/1..35/),T1(/1..35/), T2(/1..3/),
XX(/1..5/), XTEXT, YTEXT, TITEL(/1..40/), FELD,LQR(/1..502/),
LORENZ,CR(/1..500/),R4,RE,DE(/1..40/),MATRIX(/1..500/),

'PROCEDURE' JACOBI (NN), 'CODE',

'PROCEDURE' MAXIMUM (CR,C1,MAX,SS),

'ARRAY' CR ,

'REAL' MAX,SS,,

'BEGIN'

MAX := ABS(CR(/1/)),

'FOR' C3 = 2 'STEP' 1 'UNTIL' C1 'DO'

'BEGIN'

'IF' ABS(CR(/C3/)) 'GREATER' MAX 'THEN' MAX := ABS(CR(/C3/))

'ELSE'

'GOTO' M1 ,

'END' ,

M1 ,

SS := MAX,,

OUTPUT(6,(' 2/2B, (' MAXIMUM A = ')), 3B+D,DDI+DD,
2B,(' FELDIINDEX = ')), 3B+D,DDI+DD ')), SS ,C3),

'END' ,

'PROCEDURE' MAXI (CR, C1, MAX),

'ARRAY' CR ,

'REAL' MAX ,

'BEGIN'

MAX := CR(/ MAT/),

'FOR' C3 = MAT+1 'STEP' 1 'UNTIL' C1 'DO' 'BEGIN'

'IF' CR(/C3/) 'GREATER' MAX 'THEN' MAX := CR(/C3/)

'ELSE' 'GOTO' M1 ,

'END' ,

M1 ,

OUTPUT(6,(' 2/2B, (' MAXIMUM H = ')), 3B+D,DDI+DD,
2B,(' FELDIINDEX = ')), 3B+D,DDI+DD ')), MAX, C3),

'END' ,

'PROCEDURE' REDFI (TC, DELTA, LORENZ),

'REAL' TC, DELTA,,

'ARRAY' LORENZ ,

'BEGIN'

'FOR' K = 0 'STEP' 1 'UNTIL' 2 'DO'

'BEGIN'

Z := 1 + (K*W*TC)**2 ,

IR(/K/),= 2*TC /Z ,

'END' K ,

```

G.=24* IR(/0/) +48*IR(/1/) +28*IR(/2/) ,,
B.= 6*IR(/0/) + 36*IR(/1/) +46*IR(/2/) ,,
C.= 16*IR(/1/) +56*IR(/2/) ,,
U.=25.3*IR(/1/) ,, E.= -26.9*IR(/2/) ,, F.= -35* IR(/2/) ,,
'FOR' P.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 5 'DO'
'FOR' U.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 5 'DO'
A(/0,P/)=0 ,,
A(/1,1/)=G., A(/1,2/)=U., A(/1,3/)=E., A(/2,1/)=U., A(/2,2/)=B.,
A(/2,4/)=F., A(/3,1/)=E., A(/3,3/)=C., A(/3,5/)=E., A(/4,2/)=F.,
A(/4,4/)=B., A(/4,5/)=U., A(/5,3/)=E., A(/5,4/)=J., A(/5,5/)=G.
'FOR' K.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 5 'DO' 'BEGIN'
'FOR' I.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 5 'DO' 'BEGIN'
A(/I,K/)= A(/I,</) /G ,,
'END' ,,
'END' ,,
JACBI (S, 'TRUE', A,,V,ROT),,
D(/5/)= D(/1/),, D(/4/)= D(/2/),,
'FOR' I.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 5 'DO' 'BEGIN'
T1(/I/)= (DELTA **2) * D(/I/) * G * 3.05+13 ,,
T1(/I/)= 1 / T1(/I/) ,,
'END' ,,
XX(/1/)=2.24,, XX(/2/)=2.83,, XX(/3/)=3,, XX(/4/)=2.83,,
XX(/5/)=2.24,,
'FOR' K.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 5 'DO' 'BEGIN'
II(/K/)=0 ,,
'FOR' I.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 5 'DO' 'BEGIN'
II(/K/)=II(/K/) + XX(/I/) * V(/I,K/) ,,
'END' ,,
'END' ,,
BB.=0 ,,
'FOR' K.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 5 'DO' 'BEGIN'
II(/K/)= II(/K/) * II(/K/),, BB.= BB + II(/</) ,,
'END' K.,
'FOR' K.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 5 'DO' 'BEGIN'
II(/K/)= II(/K/) / BB ,,
'END' ,,
'IF' II(/1/) 'GREATER' II(/5/) 'THEN' II(/5/)=II(/1/),,
II(/1/)= II(/5/),, II(/4/)= II(/2/),,
'FOR' I.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 30 'DO'
'BEGIN'
II(/I+5/)=II(/I/),,
D(/I+5/)=D(/I/),,
T1(/I+5/)= T1(/I/),,
'END',,
JUTPUT(6,('2/ ')),,
'FOR' I.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 500 'DO' 'BEGIN'
HL.= H0Z = 500 + I*2 ,,
LORENZ (/I /)=0 ,,
'FOR' O.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 30 'DO' 'BEGIN'
Z1.= ( ( T1(/O/)**3) * (HL = H(/O/)) *1.75+7 * II(/O/)),,
Z1.= (1 + ( ( T1(/O/) * (HL -H(/O/)) * 1.75+7 )**2)) ** 2.,
LORENZ (/I /)= LORENZ(/I /) +Z1/N1 ,,
'END',,
'END',,
'END' ,,

```

PROCEDURE' STRING (S),, 'CODE',,,
PROCEDURE'NUMBER (X),, 'FORTRAN',,,
PROCEDURE'PLOT (X),, 'FORTRAN',,,

```

'PROCEDURE'AXIS (X),, 'PORTRAN',,
'PROCEDURE'SCALE (X),, 'PORTRAN',,
'PROCEDURE'FACTOR (X),, 'PORTRAN',,
'PROCEDURE'SYMBOL (X),, 'PORTRAN',,
'PROCEDURE'LINE (X),, 'PORTRAN',,

'COMMENT' BERECHNUNG DER EINZELNEN LINIEN ,,

PLOT(3,0,3,0,-3),,
FACTOR (2,0),,
  STRING(1, '( H (GS) )', XTEXT ),,
  STRING(1, '( INTENSITAET )', YTEXT ),,
  STRING(1, '( TM = )', RM),,
  STRING(1, '( TC = PS )', RE ),,
  STRING(1, '( DE = GS )', DE),,
  READ (DELTAS),,
  DEL.=0.,, AA.=93.,
  'FOR' HQZ.=3400 'STEP' 9400 'UNTIL' 12800 'DO'
  'BEGIN'
  'IF' HQZ 'EQUAL' 3400 'THEN' W.=5,981*10 'ELSE' W.=2,251*11 ,,
  OUTPUT(6, '(1*)',,
  W.=0 ,,
  'FOR' MM.=5/2 'STEP' -1 'UNTIL' -5/2 'DO'
  'BEGIN'
  OUTPUT (6, '(12/3B, '(MM = )', 3B +0,00 '(1,4M),,
  'FOR' M.= 5/2 'STEP' -1 'UNTIL' -3/2 'DO'
  'BEGIN'
  AR(/1/).=M.,, BR(/1/).=MM.,,
  'FOR' I.=2 'STEP' 1 'UNTIL' 4 'DO' 'BEGIN'
  AR(/I/).=AR(/I-1/)*M.,, BR(/I/).=BR(/I-1/)*MM.,,
  'END' ,,
  C4.= ( 4* AR(/3/) - 6* AR(/2/) + 4*AR(/1/) - 1 )*(25,25*BR(/1/) - BR(/3/))
  + ( 3*AR(/2/) - 3*AR(/1/) + 1 ) * ( BR(/4/) - 43,5*BR(/2/) + 311,5 )
  + ( 2*AR(/1/) - 1 ) * ( 43,5 - 350,525*BR(/1/) )
  + ( 25,25*BR(/4/) - 350,525*BR(/2/) - 1644,45 ) ,,
  C2.= 35/4 - BR(/2/) + BR(/1/) * ( 2*AR(/1/) - 1 ) ,,
  X.= 2*(HQZ - AA*BR(/1/)) ,, Y.=X**3 ,,
  H.= HQZ - AA*BR(/1/) - ( AA**2)*C2/X - ( AA**4)*C4/Y ,,
  W.= W + 1 ,,
  MM(/N/).=H ,,
  OUTPUT (6, '( /10B, '( H = )', 3B+0,00 , 10B, '( 1-1 = )', 3B +0,00001*00',,
  W.=1),,
  'END' M.,,
  'END' MM.,,

  OUTPUT (6, '( 5B '( DELTA = )', 3B +000 )',, DELTAS),,
  OUTPUT (6, '( 3B '( HQZ = )', 3B +00000 )',, HQZ ),,
  OUTPUT (6, '( 5B '( FREQUENZ = )', 3B+0,001*0 )',, W ),,
  'FOR' I.=0,6 'STEP' 0,3 'UNTIL' 1,5 'DO' 'BEGIN'
  TE.= 10 'POWER' M * 1' -12 ,,
  OUTPUT (6, '(14/ 3B, '( TC = )', 3B +0,001*00 )',, TE ),,
  'DEF' (TE, DELTAS, LORENZ),,
  'FOR' I.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 500 'DO'
  'BEGIN'
  FELD(/I/).=HQZ-500 *I**2 ,,
  LOR(/I/).= LORENZ (/ I/),,
  'END' I.,,
  TE.=TE * 1,01+12 ,,
  FELD(/501/).=HQZ - 500.,, FELD(/502/).= 222.,,
  MAXIMUM ( LOR,500, MAX,SS ),,
  LOR(/501/).= -SS * 1,1 ,, LOR(/502/).= SS.,,

```

```

OUTPUT (6, '( ' 3B, '( ' ANFANGSWERT = ' ) ' , 3B +D,DD'+DD ,
      3B, '( ' SCHRITTWEITE = ' ) ' , 3B +D,DD'+DD ' ) ' , LOR(/501/ ) , LOR(/502/ ) ),
LINE (FELD, LOR, 500, 1,0,4 ),
SYMBOL (0,0 ,2,2,0,09, RE,0,0, 40),
NUMBER(0,5,2,2,0,09,TE ,),0, 1 ),
TE,=TE * 1.0'-12 ,
'IF'DEL'EQUAL' 3 'THEN' X,=5 'ELSE' X,=0,,
'IF'DEL'EQUAL' 3 'THEN'Y,=-10.5 'ELSE' Y,=3.5,,
PLOT(X,Y, -3),
DEL ,=DEL +1 ,

OUTPUT(6, '( '1/ ' ) ),
PLO ,
'END' ,
'END' HJZ ,
'END'PROGRAM' ,

```

Anhang II. ALGOL-Programm zur Zerlegung der gemessenen Spektren

```

PRJTKJLL
  'BEGIN'
  'REAL' N1,Z1, T2, NE,HO,HEX,H,ENT,MAX,S,SS,T,TT,AND, P,STEA,FINA,STEH,FI
    A,AMP,AMP1,DEI,DI,DR,HA,HAD,NJLL, SUM, QUAD6,SJ446,QUAD4,FINVE,X,Y
    E1,E2,E3,E4,E5, SJ444, TEND,QUAD,,
  'ARRAY' XTEXT,YTEXT,TITEL(/1..40/),EXP,EDTA(/1..252/), MATRIX(/1..300/),
    RM,RE(/1..40/),LJR,FELD,AR,DIFF(/1..300/),M,F,D(/1..5/), AA(/1..6/),
    DELTA(/1..100/),BB(/1..6/),
  'INTEGER' I,J,N,L,K,,

  'PROCEDURE' MAXI ( AR,N,MAX,S,SS),
  'ARRAY' AR,,
  'REAL' MAX,S,SS,,
  'BEGIN'
    MAX.= ABS( AR(/1/) ),
    'FOR' I.= 2 'STEP' 1 'UNTIL' N 'DO'
      'BEGIN'
        'IF' ABS( AR(/I/) ) 'GREATER' MAX 'THEN' MAX.= ABS( AR(/I/) )
      'ELSE'
        'GOTO' M1,,
      'END'
    M1.,
  M1.,
    S.= MAX,,
    MAX.= ABS( AR(/N/) ),
    'FOR' J.= N-1 'STEP' -1 'UNTIL' 1 'DO'
      'BEGIN'
        'IF' ABS( AR(/J/) ) 'GREATER' MAX 'THEN' MAX.= ABS( AR(/J/) )
      'ELSE'
        'GOTO' M2,,
      'END'
    M2.,
    SS.= MAX,,
  'OUTPUT' (6,(' 3B, '( DELTA I = ' ), 3B+DDD,
    3B, '( AMP I ),3B+DDD ), J+2-I, S ),,
  'END' ,

  'PROCEDURE' MAXIMUM (AR,N,MAX,M,F),
  'ARRAY' AR,M,F,,
  'REAL' MAX,,
  'BEGIN'
    'FOR' J.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 6 'DO' 'BEGIN'
      A.=AA(/J/),
      MAX.= ABS( AR(/A./) ),
      'FOR' I.=A+1 'STEP' 1 'UNTIL' N 'DO'
        'BEGIN'
          'IF' ABS( AR(/I/) ) 'GREATER' MAX 'THEN' MAX.= ABS( AR(/I/) )
        'ELSE'

```

```

'GJTJ' '13.,
'END' ..
43..
    M(/J/) . = MAX ..
    F(/J/) . = I-1 ..
    F(/J/) . = A+2 - F(/J/) ..
'END' J ..
'END' ..

'PROCEDURE' MINIMUM (AR,N,MAX, M, F) ..
'ARRAY' AR,M,F ..
'REAL' MAX,
'BEGIN'
'FOR' J.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 6 'DO' 'BEGIN'
    A.=BB(/J/)..
    MAX.= ABS( AR(/A/) )..
'FOR' I.=A+1'STEP' 1 'UNTIL' 'I' 'DO' 'BEGIN'
'IF' ABS( AR(/I/) ) 'LESS' MAX 'THEN' MAX.= ABS( AR(/I/) )
'ELSE'
'GJTJ' '13 ..
'END' ..
43 ..
    M(/J/) . = MAX ..
    F(/J/) . = I-1 ..
    F(/J/) . = A+2 - F(/J/) ..
'END' J ..
'END' ..

'PROCEDURE' STRING (S) .. 'CODE' ..
'PROCEDURE' NUMBER (X) .. 'FORTRAN' ..
'PROCEDURE' PLOT (X) .. 'FORTRAN' ..
'PROCEDURE' AXIS (X) .. 'FORTRAN' ..
'PROCEDURE' SCALE (X) .. 'FORTRAN' ..
'PROCEDURE' FACTOR (X) .. 'FORTRAN' ..
'PROCEDURE' SYMBOL (X) .. 'FORTRAN' ..
'PROCEDURE' LINE (X) .. 'FORTRAN' ..

'COMMENT' EXPERIMENTELLE KURVE - EDTA KURVE ..

    PLJT (5,0,5.0,-3) ..
'FACTOR (0.7) ..
    STRING(1, '( ' FELDSTAERKE (GS) ' )', XTEXT) ..
    STRING (1, '( ' OH ' )', RM) ..
    STRING (1, '( ' AMP ' )', RE) ..
    READ (EXP, EDTA, R, HA, HAD, NULL, NE) ..
    READ (AMP, OH, STEH, FINH, AMP1, STEA, FINA, AA, 3B, E1, E2, E3, E4, E5) ..
    READ ( HO ) ..

    OUTPUT (6, '( ' 2/ 2B, '( ' AMP1 = ' )', 3B+DDD,
        2B, '( ' STEA = ' )', 3B+DD,
        2B, '( ' FINA = ' )', 3B+DD,
        2/2B, '( ' OH = ' )', 3B+DDD,
        2B, '( ' STEH = ' )', 3B+DD,
        2B, '( ' FINH = ' )', 3B+DD,
        3/2B, '( ' A1 = ' )', 3B+DD,
        2B, '( ' A2 = ' )', 3B+DDD,

```

```

2B,(' A3 = '),' 3B+DDD,
2B,(' A4 = '),' 3B+DDD,
2B,(' A5 = '),' 3B+DDD,
2B,(' A6 = '),' 3B+DDD,
2/2B,(' B1 = '),' 3B+DD,
2B,(' B2 = '),' 3B+DD,
2B,(' B3 = '),' 3B+DDD,
2B,(' B4 = '),' 3B+DDD,
2B,(' B5 = '),' 3B+DDD,
2B,(' B6 = '),' 3B+DDD,
2/ 2B,(' HAVA = '),' 3B+DDDDDD,
2B,(' NE = '),' 3B+D.D,
2B,(' E1 = '),' 3B+DD,
2B,(' E2 = '),' 3B+DD,
2B,(' E3 = '),' 3B+DDD,
2B,(' E4 = '),' 3B+DDD,
2B,(' E5 = '),' 3B+DDD '),' AMP1,STE4,FIN4,
D4,STE1,FIN4,AA(/1/),AA(/2/), AA(/3/), AA(/4/), AA(/5/),AA(/6/),
BB(/1/), BB(/2/), BB(/3/), BB(/4/), BB(/5/), BB(/6/),NJLL,NE,E1,E2,E3,E4,E5
'FOR' I.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 6 'DO' 'BEGIN'
  FELD(/I/) := HA + I * 2.7B.,
'END' ..

JUTPJT (6, (' 2/')).,
K.=1.,

FINNE:=NE+HO ..
'FOR' NE:=NE 'STEP' 0.1 'UNTIL' FINNE'DO' 'BEGIN'
'FOR' J.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 6 'DO' 'BEGIN'

  I := AA(/J/) ..
  DIFF(/I/):= EXP(/I/) - NE*EDTA(/I/) + 200 ..
'END' J ..

ENT:=NJLL + ANP.,
'FOR' HO := NULL 'STEP' 2 'UNTIL' ENT 'DO' 'BEGIN'
'FOR' P.=-FINA 'STEP' STEA 'UNTIL' FINA 'DO' 'BEGIN'
  AMP.= AMP1 + P ..
'FOR' J.=-FINH 'STEP' STE4 'UNTIL' FINH 'DO'
  'BEGIN'
  JEH.= D4 + J ..
NEX :=AIP * (DEH**2) * 1.2'+15 ..
T2:=0.57'-B / DEH ..
'FOR' J.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 6 'DO' 'BEGIN'

  I := AA(/J/) ..
  H.= HA + I * 2.7B ..
  N1:=(1 + ( (T2*(H - HO) * 1.75'+7 )**2)) **2 ..
  Z1:= ( (T2**3) * (H - HO) * 1.75'+7 ) ..
  LOR(/I/):= Z1/N1 * NEX * 0.635 ..
  H(/J/):= DIFF(/I/) - LOR(/I/) ..
'END' HO ..

QUAD6:=0., SJMA6:=0., QUAD4:=0., SJMA4:=0., SJM:=0.,
'FOR' I.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 5 'DO' 'BEGIN'
  D(/I/):= H(/I+1/) - H(/I/) ..
'END' I ..

'FOR' I.=2 'STEP' 1 'UNTIL' 4 'DO' 'BEGIN'
  SJM := SJM + D(/I/) ..

```



```

1B,1B+DOD '),' ,HE,HJ,AMP,DEH,QUAD4,SJMA4,QUAD6,SJMA6,D(/1/),TEND,
F(/1/),F(/2/),F(/3/),F(/4/),F(/5/),F(/6/)),,
QUAD5.=0., SJMA6.=0., SJM.=0.,
'FOR' I.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 5 'DO' 'BEGIN'
D(/I/).= M(/I+1/) - M(/I/) .. SUM.=SJM+D(/I/) ..
'END' I.,

'FOR' I.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 5 'DO' 'BEGIN'
SJMA6.= ABS( D(/I/) ) + SJMA6.,
QUAD6.=QUAD6 + (SJM/5=D(/I/)) **2 ..
'END' I.,

OUTPUT(6,(' 1/ 558, 1B+DOD,
1B,1B+DOD,
3B,1B+DOD,
1B,1B+DOD,
1B,1B+DOD,
1B,1B+DOD,
1B,1B+DOD,
1B, 1B+DOD,
1/ 70B, 1B+DOD,
1B, 1B+DOD,
1B, 1B+DOD,
1B, 1B+DOD,
1B, 1B+DOD,
1B,1B+DOD '),' , QUAD6,SJMA6,
M(/1/), M(/2/), M(/3/), M(/4/), M(/5/), M(/6/),
AA(/1/), AA(/2/), AA(/3/), AA(/4/), AA(/5/), AA(/6/) ),,

'FOR' I.=1 'STEP' 1 'UNTIL' 6 'DO' 'BEGIN'
AA(/I/).= AA(/I/) + 2 ..
'END' I ..

'GOTO' PLJ ..
SCALE ( MATRIX,10,0,262,1)..
OUTPUT (6,('1B,('AN')',1B+DOD, 1B,('SN')',1B+DOD))',MATRIX(/263/),
MATRIX(/264/) )..
FELD(/R+1/) .:= HAD .. FELD(/R+2/) .:= 55.55 ..
LINE( FELD, MATRIX,262,1,0,4)..
SYMBJL ( 1,0,11,0,0,2,RH,0,0,40 ),,
SYMBJL ( 15,0,11,0,0,2,RE,0,0,40 ),,
NUMBER ( 2 ,0,11,0,0,2,DEH,0,0, 1 ),,
NUMBER ( 16,0,11,0,0,2,AMP,0,0, 1 ),,
QUAD .:= (-1)**K ..
'IF' QUAD 'GREATER' 0 'THEN' X.=18 'ELSE' X.=0 ..
'IF' QUAD 'GREATER' 0 'THEN' Y.=-10 'ELSE' Y.=10 ..
PLT( X,Y,-3)..
K.=K+1.,

PLJ ..
DO..
'END' ..
'END' AMP ..
'END' J ..
'END' HE ..
SIM.,

```

Eindeutigkeit der Computerzerlegung im X- und Q-BAND

In Tabelle 1 ist dargestellt, über welchen Bereich die Parameter NE, HO, AMP, DH bei der Zerlegung der Spektren variiert wurden. Wie in Abschnitt 4.2 gezeigt, berechnet man für die nach Abzug einer Lorentzlinie verbleibenden Maxima der Matrixfraktion die Größen QUAD4, SUMA4, TEND im X-BAND bzw. QUAD6, SUMA6 im Q-BAND. Diese 5 Größen werden dann den folgenden Bedingungen unterworfen:

QUAD4	< E1	Die Wahl der E_i bestimmt dann die Zahl der
SUMA4	< E2	"Lösungen" des Verfahrens. Die exakte Lösung
TEND	> E3	ist durch das Minimum von QUAD4, SUMA4 im
QUAD6	< E4	X-BAND bzw. QUAD6, SUMA6 im Q-BAND bestimmt!
SUMA6	< E5	

So entnimmt man Tabelle 1, daß im Falle N-X die Wahl von E (4,17,0,400,100) aus 600 möglichen Zyklen nur 10 herausfiltert. Diese 10 "Lösungen" zeigen eine mittlere Linienbreite für die Exchangefraktion von DH = 216 Gs. Diejenige "Lösung", welche QUAD4 und SUMA4 bzw. QUAD6 und SUMA6 zum absoluten Minimum macht ist in Tabelle 2 dargestellt.

Die in Abschnitt 5.1 diskutierten Computerplotts wurden mit Hilfe der in Tabelle 2 zusammengefaßten Daten gewonnen.

Abb. 1 schließlich demonstriert die Genauigkeit der oben beschriebenen Computerzerlegung. Jeweils links befindet sich das Matrixsignal, berechnet aus den Daten der Tabelle 2. Rechts- das entsprechende Matrixsignal bei geringfügigen Abweichungen der Exchangefraktion hinsichtlich Amplitude und Linienbreite. Die darunter angegebenen Daten beziehen sich auf DH und AMP der zugeordneten Lorentzlinie.

Tabelle 1: Variation der Parameter NE, HO, AMP, DH bei der Computerzerlegung

	NE	HO (Gs)	AMP	DH (Gs)	Zahl der Zyklen Lösungen	E _i	Mittel- wert DH
N-X	1,0	3369-2-3379	66-2-78	208-2-242	600	4,17,0,400,100	216
P-X	0,55	3376-2-3386	94-2-102	220-2-238	405	6,10,1,200,120	233
C-X	1,3	3376-2-3386	52-4-70	226-5-272	405	5,8,0,500,200	268
N-Q	0,2-0,6	12830-2-12850	24-2-32	224-2-240	6000	50,50,-4,12,10	230
P-Q	0,6-1,6	12830-2-12860	98-2-110	184-2-202	23000	50,50,-3,90,20	200

Tabelle 2: Parameter derjenigen Lorentzlinie, welche QUAD4, SUMA4 bzw. QUAD6, SUMA6 minimallisiert

	NE	HO (Gs)	AMP	DH (Gs)	QUAD4 SUMA4 QUAD6 SUMA6			
N-X	1,0	3373	77	218	3	3	406	37
P-X	0,55	3380	103	228	0	1	39	10
C-X	1,3	3377	66	264	0	1	407	35
N-Q	0,3	12850	30	232	1	2	9	7
P-Q	0,8	12840	109	200	1	1	90	12

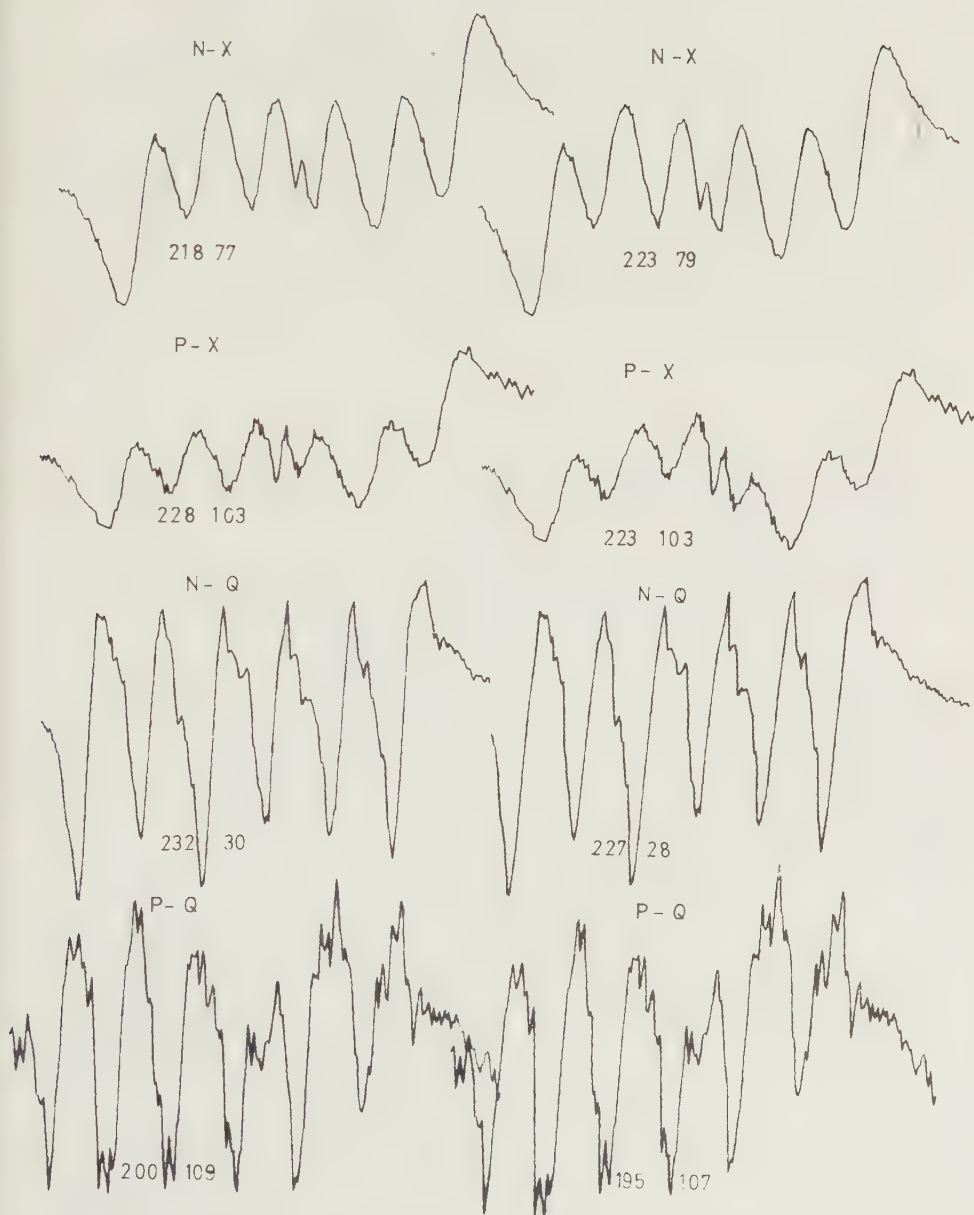


Abb. A1: Einfluß der Linienbreite und der Amplitude des Exchange-Signals auf das Matrix-Signal

ANHANG III Theorie der Linienform

In Abschnitt 3.2 wurde gezeigt, daß die Eigenwerte der Red-fieldschen Relaxationsmatrix die Linienbreiten der 5 Feinstrukturübergänge des Mn^{++} -Ions bestimmen. Die zugehörigen Intensitäten sind nach Gleichung 13 berechenbar. Ihre Ableitung soll hier gegeben werden. Dazu ist es nötig, zuerst eine allgemeine Beschreibung einer ESR-Absorptionslinie zu geben. Anschließend soll dann gezeigt werden, daß unter der Voraussetzung $T_c \ll T_2$ und unter Zuhilfenahme der Relaxationsmatrix, sich die Absorptionslinie aus einer Superposition von 5 Lorentzlinien ergibt.

(a) Theorie der Linienform (24)

Zur Lösung der Blochschen Gleichungen wird die komplexe Suszeptibilität $\chi = \chi' - i \chi''$ eingeführt. Damit kann die Magnetisierung in x-Richtung angegeben werden:

$$(1) \quad \begin{aligned} H_x &= 2 H_1 \cos \omega t & \omega &= \text{Frequenz des Radiofrequenzfeldes} \\ M_x &= 2 H_1 \chi' \cos \omega t + 2 H_1 \chi'' \sin \omega t \end{aligned}$$

χ'' beschreibt bis auf einen Proportionalitätsfaktor die Form der ESR-Absorptionslinie.

Die Magnetisierung M_x muß hierbei als Mittelwert über alle Spins der Probe aufgefaßt werden. $\langle \bar{M}_x \rangle$ ist damit nach der Dichtematrix-Theorie berechenbar:

$$(2) \quad \langle \bar{M}_x \rangle = \text{Spur} \left(\hat{S}(t) \hat{M}_x \right)$$

Das quantenmechanische Spinsystem werde durch den folgenden Hamilton-Operator beschrieben:

$$(3) \quad \begin{aligned} \hat{H}_{\text{tot}} &= \hat{H} + \hat{H}_{\text{rf}} & \hat{H}_{\text{rf}} &= 2 H_1 V \hat{M}_x \cos t \\ \hat{H} &= \hat{H}_{\text{statisch}} + \hat{H}(t) \end{aligned}$$

$\hat{H}$ beschreibt die statischen und zeitabhängigen Wechselwirkungen, denen das Spinsystem ausgesetzt ist.

$\hat{H}_{\text{rf}}$ beschreibt den Einfluß des linear polarisierten Radiofrequenzfeldes H_x auf das Spinsystem.

V: Volumen der Probe

Mit Gleichung (3) kann die Bewegungsgleichung der Dichtematrix (vgl. Gl.6 Abschnitt 3.2) angegeben werden.

$$(4) \quad \frac{d \hat{S}}{dt} = \frac{i}{\hbar} [\hat{S}, \hat{H}] + \frac{i}{\hbar} [\hat{S}, 2 H_1 V \hat{M}_x \cos \omega t]$$

Integration dieser Gleichung und Einführung der Variablen $\tau = t - t'$ ergibt in erster Näherung:

$$(5) \quad \langle \hat{M}_x \rangle = \frac{2iH_1 V}{\hbar} \text{Spur} \left\{ \int_0^\infty [\hat{S}_0 \exp(-i\hat{H}\tau/\hbar) \hat{M}_x \exp(i\hat{H}\tau/\hbar)] \hat{M}_x \cos \omega(t-\tau) d\tau \right\}$$

Vergleicht man die Gleichungen (5) und (1) so erhält man für χ'' unter der Voraussetzung "hoher Temperaturen" den folgenden Ausdruck:

$$(6) \quad \chi''(\omega) = \frac{V \omega}{kT \text{Spur} \mathcal{E}} \int_0^\infty G(\tau) \cos \omega \tau d\tau$$

$$(7) \quad G(\tau) = \text{Spur} (\hat{M}_x(\tau) \hat{M}_x) \text{ wird als Relaxationsfunktion bezeichnet}$$

$\mathcal{E} = \text{Einheitsoperator}$

$G(\tau)$ darf nicht verwechselt werden mit der in Abschnitt 3.2 eingeführten Korrelationsfunktion.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Linienform die Fouriertransformierte der Relaxationsfunktion ist. Das Problem besteht nun darin, die Relaxationsfunktion für das entsprechende Spinsystem zu berechnen.

(b) Linienform für fünffachentartete ESR-Übergänge (25)

Unter der Voraussetzung kleiner Korrelationszeiten ($\tau_c < T_2$) kann die Relaxationsfunktion mit Hilfe der Redfieldtheorie berechnet werden. Ohne Berücksichtigung der Hyperfein-Wechselwirkung und der Nullfeldaufspaltung gibt es im Magnetfeld 6 äquidistante Energieniveaus mit 5 möglichen ESR-Übergängen gleicher Frequenz ("entartete Übergänge") $\omega_0 = (E_a - E_a)/\hbar$

Die Bewegungsgleichung der Matrixelemente von $\hat{M}_x$ ergibt sich zu:

$$(8) \quad \frac{d(\hat{M}_x^*(\tau))_{aa'}}{d\tau} = \sum_{bb'} R_{aa',bb'} (\hat{M}_x^*(\tau))_{bb'}$$

mit $\hat{M}_x^*(\tau) = \exp(i\hat{H}\tau/\hbar) \hat{M}_x \exp(-i\hat{H}\tau/\hbar)$

Gleichung (7) kann nun umgeschrieben werden:

$$(9) \quad G(\tau) = e^{i\omega_0\tau} \sum_{aa'} (a | \hat{M}_x^*(\tau) | a') (a' | \hat{M}_x | a)$$

Die Summation geht dabei nur über diejenigen a, a' , für welche $E_a - E_{a'} = \omega_0/\hbar$.

Faßt man $(a | \hat{M}_x | a')$ und $(a | \hat{M}_x^*(\tau) | a')$ als Komponenten der Fünfer-Vektoren $\vec{X}$ und $\vec{X}(\tau)$ auf, so beschreibt $R_{aa',bb'}$ eine Transformation zwischen diesen beiden Vektoren. Die Lösung der Gleichung (8) kann damit angegeben werden:

$$(10) \quad X_v(\tau) = \sum_{v'} (\exp R\tau)_{vv'} X_{v'}$$

Hiermit kann die Relaxationsfunktion umformuliert werden:

$$(11) \quad G(\tau) = e^{i\omega_0\tau} \left(\vec{X}^* e^{R\tau} \vec{X} \right)$$

Bezeichnet man mit $\lambda_1 \dots \lambda_5$ und $\vec{v}_1 \dots \vec{v}_5$, die Eigenwerte und Eigenvektoren der Relaxationsmatrix, so erhält man nach Einsetzen von Gleichung (10) in (9):

$$(12) \quad G(\tau) = e^{i\omega_0\tau} \sum_{j=1}^5 (|\vec{X} \cdot \vec{v}_j|)^2 e^{\lambda_j\tau}$$

$G(\tau)$ stellt sich nun als Summe von 5 Exponentialfunktionen dar. Dabei müssen aus physikalischen Gründen (Dissipation der Magnetisierung M_x) die Realteile von λ_j negativ sein. Die Imaginärteile beschreiben dann eine Frequenzverschiebung der Absorptionslinie, auf welche hier nicht eingegangen werden soll.

Geht man mit Gleichung (12) in Gleichung (6) ein, so erhält man eine Absorptionskurve, die sich aus 5 überlagerten Lorentzkurven zusammensetzt. Die Relaxationsraten der einzelnen Lorentzkurven sind:

$$(1/T_2)_j = -\lambda_j !$$

Die relativen Intensitäten berechnen sich zu: $(INT)_j = \frac{(\vec{X} \cdot \vec{v}_j)^2}{\sum_{j=1}^5 (\vec{X} \cdot \vec{v}_j)^2} .$

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1 Stoeckenius W., Racker E.; Membranes of Mitochondria and Chloroplasts S. 53, v. Nostrund Reinhold, New York 1970
- 2 Vasington F.D., Murphy J.V. J.Bio.Chem. 237 (62) 267
De Luca H., Ergstrom G., Proc.Nat.Acad.Sci.USA 47 (61) 1744
- 3 Carafoli E. Biochimie 55 (73) 755
- 4 Gunter T., Puskin J., Biophys. J. 12(72) 625
- 5 Reynafarje B., Lehninger A. J. Bio.Chem. 249 (74) 6067
Lehninger A. Proc.Nat. Acad.Sci.USA 71 (74) 1520
- 6 Bode c., Goebell H. Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 6 (68) 418
- 7 Clark L. J.appl.Physiol. 6 (53) 189
- 8 Estabrook R.W. in Methods in Enzymology X ed. Estabrook, Academic Press, New York
- 9 Scherer B., Klingenberg M. Biochem. 13 (74) 161
- 10 Lehninger A. The Mitochondrion, W.A. Benjamin inc. Amsterdam 65
- 11 Reynafarje B., Lehninger A. J.Bio.Chem. 244 (69) 584
- 12 Carafoli E., Gazzotti P. in Mechanisms in Bioenergetics S. 293
ed. G. Azzone, Acad.Press, New York
- 13 Leena M. Arch.Biochem. Biophys. 123 (68) 286
- 14 Vasington F., Carafoli E. Biochim.Biophys.Acta 256 (72) 43
- 15 Chappel J. in Energy linked Funktions of Mitochondria S. 219
ed. B. Chance, Acad.Press, New York
- 16 Lehninger A. Biochem J. 119 (70) 129
- 17 Abragam A., Bleaney B. in Electron Paramagnetic Resonance of Transition IONS, S. 142ff. und 436ff., Clarandon Press, Oxford 1970
- 18 Hurd F., Sachs M., Hershberger W. Physics Rev. 93 (54) 373
- 19 Yarmus L., Kukk M., Sundheim B. J.Chem.Phys. 40 (64) 33
- 20 Anderson P. J.Phys.Soc.Japan 9 (54) 316
- 21 Mc Garvey B. J.Phys.Chem. 61 (57) 1232
- 22 Luckhurst G. in Elektron Spin Relaxation in Liquids S. 313
ed. Muus L., Atkins P., Plenum Press, New York 1972
- 23 Redfield A. in Advances in Magnetic Resonance, Vol 1, ed Waugh J. Acad.Press New York 1965

- 24 Atherton N.M., Elektron Spin Resonance S.267 ff.
Ellis Horwood Limited, Chichester (73)
- 25 Abragam A. The Principles of Nuclear Magnetism S.443,
Univ. Press, Oxford, London 1961
- 26 v.Goldammer E., Müller A. Ber.Bunsen Gesells.Phys.Chem.78 (74)35
- 27 v.Goldammer E., Zorn H. Eur.J.Biochem. 44 (74) 195
- 28 Reed G., Leigh Jr.J.,Pearson J. J.Chem.Phys. 55(71) 3311
- 29 Binsch G. Molecular Physiks 15 (68) 469
- 30 Garret B.,Morgan L. J.Chem.Phys. 44 (66) 890
" " " 39 (63) 326
- 31 Gunter T., Puskin J. Biophys.J. 15 (75) 319
- 32 Puskin J., Gunter T. Biochem.Biophys.Research Com. 51 (73) 797
- 33 Lehninger A., Rossi C., Greenawalt J. " 10 (63) 444
- 34 Hollocker T. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 47 (61) 1355
- 35 Lynden-Bell R.M. Mol.Phys. 8 (64) 71
- 36 Freed J.H. Phys.Chem. 71 (67) 38
- 37 Weidemann M.,Erdelt H., Klingenberg M. Eur.J.Biochem. 16(70)313
- 38 Huang c.,Charlton J. Biochem.Biophys.Res.Com. 46 (72) 1660
- 39 Schnaitman C., Greenawalt J. J.Cell.Biol. 38 (68) 158
- 40 Mitchell P. (66) Chemiosmotic Coupling in Oxidative and
Photosynthetic Phosphorylation, Bodmin: Glynn Research Ltd.
- 41 Singer S., Nicowon G. Science 175 (72) 720
- 42 Blumberg W.,Peisach J. Arch.Biochem.Biophys. 162 (74) 502
- 43 Keith A.,Sharnoff M.,Cohn G. Biochem.et Biophys.Acta 300(73)379
- 44 Sackmann E.,Träuble H.Biochemistry 12 (73) 5360
- 45 Keith A. Biophys.J. 10 (70) 618
- 46 Hubell W.,Mc Connel H. J.americ.chem.Soc 93 (71) 314
- 47 Jost P.,Waggoner A.,Griffith O. in Structure and Function
of Biological Membranes S.84 ed. Rothfield Acad.Press, New York
- 48 Griffith O.,Dehlinger P. J.Membrane Biol. 15 (74) 159
- 49 Selig J. J.americ.Soc. 92 (70) 3881
- 50 Azzi A., Bragabin M.,Tanburro A.,Santato M.
J.Biol.Chem. 248 (73) 5520
- 51 Champbell I.,Dwek R.,Price N.,Radda G. Eur.J.Biochem.30 (72)339
- 52 Leigh Jr J. J.Chem.Phys. 52 (70) 2608
- 53 Klingenberg M. Essays in Biochemistry 6 (70) 119
- 54 Givarneri,Steckmiller J.Bio.Chem. 246 (71) 7526

L e b e n s l a u f

13.5.1946	Geburt in München Eltern: Friedrich Brunner Gertrud Brunner, geb. Wenzel
1.9.1952 - 30.6.1956	Besuch der Volksschule an der Flur- straße in München
1.9.1956	Übertritt in das Luitpold-Gymnasium in München
Juli 1965	Abitur
WS 65/66	Studienbeginn an der Ludwig-Maximilian- Universität in München
WS 67/68	Vordiplomprüfung in Physik
SS 69 - WS 71/72	Diplomarbeit bei Dr. Krause, Lehrstuhl Prof. Dr. W. Rollwagen (Sektion Physik)
31.1.1972	Diplomprüfung in Physik
5.6.1972	Verehelichung mit Julika Wagner
1.9.1972	Bearbeitung des vorliegenden Themas bei Prof. Dr.M. Klingenberg und Prof. Dr.J. Voitländer (Institut für Physikalische Biochemie bzw. Physikalische Chemie).

